

Beitrag zur Wirkstoffphysiologie
von Mucor Ramannianus Möller und Mucor Ramannianus
Möller var. angulisporus Naoumoff

Inaugural-Dissertation

der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Félix Pierre Debrit

von Genf



VERLAG PAUL HAUPT BERN 1950

Beitrag zur Wirkstoffphysiologie
von Mucor Ramannianus Möller und Mucor Ramannianus
Möller var. angulisporus Naoumoff

Inaugural-Dissertation

der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Félix Pierre Debrit

von Genf



VERLAG PAUL HAUPT BERN 1950

Von der philosophischen Fakultät II der Universität Bern auf Antrag
von Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer angenommen.

Bern, den 27. Oktober 1949

Der Dekan: sig. J. Cadisch



INHALTSVERZEICHNIS DES I. TEILS

I. Einleitung und Fragestellung	5
II. Allgemeine kulturelle Eigenschaften von <i>Mucor Ramannianus</i>	5
1. Stickstoffquellen und Aneurinwirkung	6
2. Einfluß der Vorstufen des Thiazols auf das Wachstum von <i>M. Ramannianus</i>	11
3. Wachstumsversuche mit <i>M. Ramannianus</i> in Funktion der Zeit	12
III. Untersuchungen über die Varietät <i>M. Ram. angulisporus</i>	13
1. Auxo-autotrophie von <i>M. Ram. angulisporus</i>	13
2. Symbiose zwischen <i>M. Ramannianus</i> und <i>M. angulisporus</i> einerseits und <i>Rhodotorula rubra</i> anderseits	19
IV. Der Bedarf an Wachstumsfaktoren von <i>M. angulisporus</i>	23
1. Wuchsstoffe	23
2. Aminosäuren	30
3. Versuche mit einer Spurenelementmischung	33
V. Extrakte aus natürlichen Produkten als Quelle für Wachstumsfaktoren für <i>M. angulisporus</i>	35
1. Hefe, Weizenkeime, Bierwürze	35
2. Extrakte von Blättern höherer Pflanzen	45
3. Wirkung des Harns als Wachstumsfaktor	48
4. Wirkung von Extrakten von Mycelien und entsprechendem Milieu von <i>M. angulisporus</i> und <i>M. Ramannianus</i> auf andere Kulturen von <i>M. angu-</i> <i>lisporus</i>	49
VI. Zusammenfassung	52

INHALTSVERZEICHNIS DES II. TEILS

I. Einleitung	54
II. Chemie des Biotins	54
III. Bestimmungsmethoden des Biotins	56
IV. Der Gehalt an Biotin des Thallus und der Nährlösung von <i>Mucor Raman-</i> <i>nianus</i> und <i>M. Ram. angulisporus</i> in Funktion des Aneurins	58
1. Vorbereitung der Extrakte	58
2. Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Biosynthese des Biotins ..	59
a) Asparagin	59
b) Ammoniumcitrat	60
c) Glykokoll	62
V. Der Gehalt an Biotin des Thallus und der Nährlösung von <i>M. Ramannianus</i> und <i>M. Ram. angulisporus</i> in Funktion der Zeit	63
VI. Einfluß von Wuchsstoffen und Aminosäuren auf die Biosynthese des Biotins durch <i>M. Ram. angulisporus</i>	66

A. Wuchsstoffe

1. Pyrimidin	66
2. Thiazol	67
3. Inositol	67
4. Pantothensäure	68
5. Nikotinsäure	69
6. Pimelinsäure	69
7. Desthiobiotin	71
8. Biotin	72
9. d,l- ψ -Biotin	73

B. Aminosäuren

1. Versuche mit 2 Mischungen von Aminosäuren	77
2. β -Alanin	78
3. Schwefelhaltige Aminosäuren	79
VII. Zusammenfassung	83

I. Einleitung und Fragestellung

Der Bedarf eines Organismus an Wuchsstoffen ist auf den Verlust der Fähigkeit, diese Wuchsstoffe selbst zu synthetisieren, zurückzuführen. In diesem Fall spricht man von einem auxo-heterotrophen Organismus. Ein Organismus ist dann auxo-autotroph, wenn er für seine Entwicklung keiner zusätzlichen Wuchsstoffe bedarf.

Es ist der Zweck dieser Arbeit, die Bedingungen zu untersuchen, unter welchen diese Auxo-autotrophie und -heterotrophie Gültigkeit besitzt. Als Untersuchungsobjekt wurde eine Mucorinee, *Mucor Ramannianus* Möller, gewählt, die für Aneurin oder nur Thiazol heterotroph ist. Eine Varietät, *M. Ram. var. angulispurus*, erwies sich als auxo-autotroph gegenüber Aneurin und seine Komponenten. Daraus erwuchs die Aufgabe, den Grad dieser Auxo-autotrophie zu bestimmen, d. h., die Frage zu prüfen, ob diese Autotrophie total oder nur partiell sei. Diese Versuche werden im I. Teil behandelt.

Der II. Teil befaßt sich mit der Biosynthese des Biotins dieser beiden Organismen. Es ist bekannt, daß verschiedene Mikroorganismen das Biotin in großer Quantität in die Nährlösung abscheiden. Dies trifft auch zu für *M. Ramannianus* und *M. Ram. angulispurus*. Es wird namentlich geprüft werden, unter welchen Bedingungen diese Biosynthese des Biotins gefördert oder gehemmt werden kann.

II. Allgemeine kulturelle Eigenschaften von *Mucor Ramannianus* Möller

Die für die meisten Mucorineen anwendbare Nährlösung ist die von Coon vorgeschlagene (modifiziert), bestehend aus

Glucose	5 ‰
Asparagin	1 ‰
MgSO ₄	0,5 ‰
KH ₂ PO ₄	1,5 ‰

Die Versuche wurden jeweils in 150 ccm Erlenmeyerkolben angesetzt. Als Pfropfen diente reinste Spitalwatte. Wenn nichts anderes vermerkt ist, wurde die Nährlösung 15 Minuten bei 115° im Autoclaven sterilisiert. Als Impflösung wurde eine Sporensuspension verwendet. Davon wurden 2—3 Tropfen mit steriler Pipette jedem Kolben zugegeben. Der Nachteil dieses Pilzes als Untersuchungsobjekt ist darin zu sehen, daß *Mucor Ram.* eine lange Wachstumsdauer besitzt. Nach Müller (9) tritt die Sporangien-

reife erst etwa nach 14—15 Tagen ein. Vom 30. Tag an verlangsamt sich das Wachstum, die Kurve wird flacher, steigt aber nichtsdestoweniger bis zum 2. Monat an. Diese Wachstumssteigerung im zweiten Monat ist jedoch nicht dermaßen, daß sie es uns nicht gestattet hätte, praktischerweise die Kulturen jeweils nach 30 Tagen zu ernten. Die Mycelien wurden filtriert, gewaschen, bei 100° im Trockenschrank getrocknet und gewogen. Die erhaltenen Resultate sind Durchschnittswerte von meistens 12 Kulturen.

Was das Wuchsstoffbedürfnis von *Mucor Ramannianus* anbelangt, so wissen wir jetzt, daß er des Aneurins bedarf, daß er aber befähigt ist, wenn ihm die eine Komponente des B₁ vorgelegt wird, nämlich Thiazol, das Aneurinmolekül aufzubauen, da er die andere Komponente, das Pyrimidin, selbst synthetisiert (8, 9, 10).

1. Stickstoffquellen und Aneurinwirkung

Ueber die Rolle der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie des Aneurins hat Müller bereits eingehend berichtet (9). Uns ging es darum, auf einige spezielle Probleme näher einzugehen, namentlich auf die wichtige Frage der Stickstoffquellen.

a) *Wachstumsversuche auf verschiedenen N-Quellen in Funktion des Aneurins*

In der Arbeit von Müller (9) wird die optimale Ausnützung des Asparagins mit 1 ‰ angegeben. Das Wachstum kommt aber erst bei einer Konzentration von 20 ‰ zum Stillstand. Als weitere N-Quellen wurden verwendet:

Glykokoll
Ammonium-Citrat
» -Tartrat
» -Sulfat
» -Nitrat
Kaliumnitrat

Diese Salze wurden in einer Konzentration von $\frac{1}{100}$ molar gebraucht. Sie näherten sich dadurch der molekularen Konzentration einer 1 ‰igen Asparaginlösung. Die in *Tabelle 1* wiedergegebenen Resultate zeigen deutlich, daß von den geprüften N-haltigen Salzen 2 sich besonders auswirken: Asparagin und Ammoniumcitrat, wobei das Ammoniumcitrat höhere Trockengewichte abgibt als Asparagin. Diese Entwicklung werden wir im Laufe unserer Untersuchungen immer wieder feststellen. Diese wachstumsfördernde Wirkung des Ammoniumcitrats scheint nicht auf sein NH₄-Ion zurückführbar zu sein, denn die andern Ammoniumsalze geben viel tiefere Trockengewichtswerte ab. Vielmehr muß das Citrat-Ion dafür verantwortlich gemacht werden.

Tabelle 1

Wachstum von *Mucor Ramannianus* auf verschiedenen Stickstoffquellen, in Funktion des Aneurins. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Gewicht der Kulturen in mg.
Sp = Spuren. K = Kontrollen

B ₁ in γ	0,01	0,02	0,05	0,1	0,25	0,5	1	2	2,5	5	10	K
Asparagin	26	46,7	61,4	100	128,5	146,1	145	142,2	150,1	134,6	138,5	9
Glykokoll	14,6	28,6	46,2	58,7	87	91,5	92,4	96	91,8	92,1	79	2
NH ₄ -Citrat	4,5	6	6,5	8,7	35,8	79,4	119,8	135,3	147,3	179	170	1
NH ₄ -Tartr.	3,5	5	5,5	12	41,2	70,8	101,7	120	116,3	116,3	107	1
NH ₄ -Sulfat	4,7	6,5	8,2	17,2	25,7	33	40,3	40,5	32,6	35,2	33,2	Sp
NH ₄ -Nitrat	5,2	9	20,4	27,5	34,8	40,2	55,8	50,5	42,5	38,5	38,2	Sp
KNO ₃	12,5	22	37,2	51,1	86,8	86,6	82	66,7	54	62,8	77,7	Sp

Es ist ein in der Biologie häufig auftretender Fall, daß nur eine bestimmte Molekülkonfiguration von Mikroorganismen verwendet werden kann. Das Ammonium-Tartrat, obschon auch ein Salz einer mehrbasischen Oxyssäure, weist eine um 33 % schlechtere Ausbeute auf als das gleiche Salz der Citronensäure.

Noch schlechter schneiden die anorganischen Ammoniumsalze ab, dagegen eignet sich offenbar das Kaliumnitrat zur Stickstoff Assimilation besser. Die Trockengewichtswerte dieses Salzes nähern sich denjenigen mit Glykokoll. Diese Beobachtung machte bereits Müller (9).

Vergleicht man die Salze in bezug auf Aneurin, so ergibt sich die Tatsache, daß die Trockenhöchstgewichte mit Ausnahme des Kaliumnitrates durchwegs mit Konzentrationen erhalten werden, die zwischen 1 γ und 5 γ liegen. Mit supraoptimalen Dosen von 10 γ B₁ gehen die Gewichte überall wieder zurück. Obschon das Ammoniumcitrat die höheren Trockengewichte liefert, scheint das Asparagin doch insofern einen Vorteil zu besitzen, als es auf kleine Dosen B₁ besser reagiert. Schon die Kontrollen sind auf Asparaginmilieu am höchsten. Mit 0,1 γ B₁ erreichen die Werte mit Asparagin bereits 100 mg, mit Citrat aber erst 8,7 mg. Bei 2 γ B₁ haben die Citratwerte die Asparaginwerte aufgeholt, um sie bei 5 γ zu überflügeln. Das Ammonium-Tartrat weist eine ähnliche Entwicklung auf, nur daß hier die Trockengewichte nicht über 120 mg kommen, die mit 2 γ erreicht werden. Mit der von uns gebrauchten Konzentration von $\frac{1}{100}$ M kommen Glykokoll, Ammonium-Nitrat, -Sulfat und Kaliumnitrat nicht über 100 mg.

b) *Einfluß der Asparagin- und Glykokollkonzentration
mit und ohne Pepton*

Das Wachstum eines Mikroorganismus ist im allgemeinen stark beeinflußt durch die Art der dargebotenen Stickstoffquelle und auch durch dessen Konzentration. So geht oft eine Verdoppelung der Stickstoff-Konzentration einer solchen der Trockengewichte parallel. Dies scheint namentlich für Asparagin der Fall zu sein und wird deshalb als Co-Faktor bezeichnet (15). Daß *M. Ramannianus* auf eine höhere Asparagin-Konzentration ebenfalls mit höheren Trockengewichten antwortet, wurde bereits erwähnt.

In einem Versuch unternahmen wir es, den Einfluß der Glykokoll-Konzentration auf das Wachstum mit gleichbleibender Aneurin-Konzentration (2,5 γ Aneurin pro Kultur) zu prüfen.

Nach *Tabelle 2* zeigt sich, daß die Glykokoll-Konzentration von 10 ‰ , d. h. 1 ‰ , die höchsten Trockengewichte abgibt, obschon sie nur 50,8 ‰ höher liegen als die Werte mit 0,5 ‰ Glykokoll.

Tabelle 2

Einfluß der Glykokoll-Konzentration auf das Wachstum von *M. Ramannianus*. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 6 Kulturen.

Glykokollkonz. in ‰	Trockengewichte in mg
0,5	47,1
1	58,6
2	63,3
5	61,2
7	66,9
10	71,5
20	68,0
50	56,8
100	20,6

Noch höhere Konzentrationen hemmen das Wachstum. Die beste Ausnützung des Glykokolls erfolgt aber bei 2 ‰ .

Im zweiten Versuch galt es, Asparagin und Glykokoll nebeneinander zu beobachten, dazu die Wirkung einer Zugabe einer 0,5 ‰ igen Peptonlösung zu studieren. Die Aneurin-Konzentration betrug für alle Kulturen 2,5 γ . Erwartungsgemäß vermochte das Pepton überall eine Wachstumssteigerung zu bewirken.

Tabelle 3

Einfluß der Asparagin- und Glykokollkonzentration auf das Wachstum von *M. Ram.* Alter der Kulturen 31 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 6 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Zunahme in %.

Asparagin 1 ‰	ohne Pepton	76,0 mg	
» » mit »		167,3 mg	(+ 120,1 ‰)
» 3 ‰	ohne »	86,6 mg	
» » mit »		178,8 mg	(+ 106,4 ‰)
Glykokoll 1 ‰	ohne »	60,1 mg	
» » mit »		179,7 mg	(+ 199 ‰)
» 3 ‰	ohne »	56,1 mg	
» » mit »		198,1 mg	(+ 253,1 ‰)
» 5 ‰	ohne »	147,4 mg	
» » mit »		208,7 mg	(+ 41,5 ‰)

Und zwar wirkte sich dieser Mehrzuwachs so aus, daß er mit Glykokoll deutlicher ausfällt als mit Asparagin. Die in ‰ ausgedrückten Mehrwerte geben ein deutliches Bild. Die höchste Steigerung von 253,1 ‰ erhalten wir mit 3 ‰ Glykokoll in der Nährlösung. Die Wirkung mit 1 ‰ Glykokoll ist auch noch gut, während stärkere Konzentrationen von Glykokoll an und für sich ja schon wachstumsfördernd wirken, und somit scheint das Pepton dem Organismus weniger nötig zu sein. Dies mag wohl auch der Grund sein, warum Pepton sich mit Asparagin weniger auswirkt, weil diese Stickstoffquelle, wie wir gesehen haben, für *M. Ramannianus* sehr vorteilhaft ist. Es kann deshalb als sicher angenommen werden, daß sich im Pepton und, wie wir später sehen werden, in andern natürlichen Extrakten, Stoffe befinden, die auf *M. Ramannianus* einen positiven Einfluß auf dessen Wachstum besitzen und die sogar um Vieles die mit der optimalen Dosis B₁ erhaltenen Trockengewichtswerte vermehren können.

c) Möglichkeiten des Glucose-Ersatzes durch verschiedene Stickstoffquellen

Im Anschluß an die unter a) beschriebenen Versuche, machten wir es uns zur Aufgabe, zu untersuchen, ob der bemerkte Mehrzuwachs von *M. Ramannianus* auf Citratmilieu unter Umständen auf die Verwendung des Citrationes als C-Quelle zurückzuführen ist. Schon Müller (12) zeigte, daß *M. Ram.* nicht im Stande ist seinen organischen Kohlenstoff aus dem Asparagin zu decken. Wohl aber eignen sich dazu die verschiedensten Kohlehydrate.

Wir verwendeten 3 Ammoniumsalze: NH₄-Citrat, NH₄-Tartrat und NH₄-Nitrat. Letzteres wurde deshalb gewählt, um ganz sicher zu gehen, daß das NH₄-Ion nicht der Anlaß sei zu einem möglichen Wachstum. Träte ein solches mit NH₄-Nitrat ein, so müßte in diesem Fall die Frage des Einflusses des NH₄-Iones wieder erneut herangezogen werden. Daß

dies wahrscheinlich nicht der Fall sein wird, wurde oben bereits festgelegt. Die Versuche wurden mit und ohne Glucose angesetzt (siehe *Tabelle 4*).

Tabelle 4

Versuch des Glucose-Ersatzes durch verschiedene N-Quellen. Alter der Kulturen 30 Tage
Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Sp = Spuren. K = Kontrollen.

Aneurin in γ	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	K
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
NH ₄ -Citrat + Gluc.	5,3	4,6	8,3	67,0	117,8	184,6	139,1	Sp
» ohne »	—	(+)	(+)	(+)	(+)	++	+++	—
NH ₄ -Tartrat + »	2,8	4,5	8,5	56,6	97,0	88,9	102,4	Sp
» ohne »	—	—	—	—	—	—	+	—
NH ₄ -Nitrat + »	7,8	13,3	22,1	43,7	52,6	46,2	50,6	Sp
» ohne »	—	—	—	—	—	—	—	—

Wie ersichtlich nehmen die Kulturen mit Glucose als C-Quelle einen normalen Verlauf. Die Kulturen ohne Glucose dagegen zeigen nur spurenhafte Wachstum, das wir wie folgt ausdrücken: +++ (starke Spurenbildung), ++ und + (schwache Spurenbildung), — (keine Spurenbildung). Man erkennt noch eine relativ starke Spurenbildung mit supraoptimalen Dosen B₁ auf Citratmilieu, schwache Spurenbildung mit 10 γ B₁ auf Tartratomilieu und überhaupt kein Wachstum auf Nitratmilieu.

Dies erlaubt uns zu sagen, daß weder das Citrat- noch das Tartration als möglicher C-Lieferant auftritt. Immerhin müssen wir festhalten, daß das Citratmilieu nichtdestoweniger günstiger zu sein scheint, erhalten wir doch noch mit 0,05 γ B₁ spurenweises Auftreten von *Mucor Mycelien*.

Der zweite Schritt bestand darin, zu untersuchen, ob eine Zugabe verschiedener Konzentrationen von NH₄-Citrat zu glucosefreier Coon'scher Nährlösung einen Effekt auf das Wachstum von *M. Ramannianus* erzielte. Jede Kultur enthielt 5 γ B₁.

Tabelle 5

Einfluß der NH₄-Citratkonzentration + Asparagin, ohne Glucose auf das Wachstum von *M. Ram.* Alter der Kulturen 35 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen.

Konz. NH ₄ -Citrat in ‰	Myceltrockengewichte in mg
Asparagin 1 ‰ + NH ₄ -Citr. 1 ‰	6,0
» + » 3 »	6,8
» + » 5 »	7,2
» + » 10 »	6,8
» + » 50 »	0,3
» + » 100 »	—

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, erhalten wir Trockengewichtswerte von 7,2 mg bei einer Zugabe von 5 ‰ NH_4 -Citrat, während die Kontrollen nur spurenhafte Wachstum besitzen. Aber noch mit 1 ‰ Citrat gelangen wir zu einem Mycel-Trockengewicht von 6 mg. Stärkere Konzentrationen dagegen hemmen. Wir stehen vor der Tatsache, daß *M. Ramannianus* ohne Glucose weder mit Asparagin noch mit Ammoniumcitrat wächst, daß aber diese beiden N-Quellen kombiniert einen gut nachweisbaren wachstumsfördernden Effekt erzielen.

2. Einfluß der Vorstufen des Thiazols auf das Wachstum von *Mucor Ramannianus* Möller

Die Versuche dieses Kapitels gehen auf die Arbeiten von Bonner und Buchmann (2) zurück. Diese Autoren erzielten mit den Vorstufen des Thiazols, Thioformamid und Chloracetopropanol, plus Pyrimidin ein gleichgutes Wachstum von Pisumwurzeln wie mit B_1 allein. Die Pisumwurzel kann also das Thiazol aus seinen Vorstufen synthetisieren. Die Synthese des Thiazols kann aber auch in vivo mit Acetopropanol stattfinden.

Es ist genügend bekannt, daß *M. Ramannianus* nur auf die eine Komponente des Aneurins, nämlich das Thiazol, angewiesen ist, um zu einem Wachstum zu gelangen (9). Es drängte sich deshalb die Frage auf, ob *M. Ram.* befähigt ist, das Thiazol aus seinen Vorstufen aufzubauen.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf 5 verschiedene Nährmedien, die durch ihre Stickstoffquelle differieren:

Glucose	5 ‰
MgSO_4	0,5 ‰
KH_2PO_4	1,5 ‰

Diesem Grundmilieu gaben wir die 5 N-Salze in folgender Konzentration zu:

Asparagin	1 ‰
Glykokoll	1/100 M
NH_4 -Citrat	
KNO_3	
Urea	

Für die Serien mit festen Nährböden kam noch 2 ‰ Agar hinzu.

Die Kulturen erhielten die Thiazolvorstufen * steril, einzeln und gemischt in Mengen von total 20 γ nach folgender Aufstellung:

- | | |
|-----------------------------|-------------|
| 1. Kontrollen | 6. T + AP |
| 2. Thiazol (T) | 7. T + CAP |
| 3. Thioformamid (TA) | 8. TA + AP |
| 4. Acetopropanol (AP) | 9. TA + CAP |
| 5. Chloracetopropanol (CAP) | |

* Das Thioformamid wurde kalt sterilisiert mittelst eines Bakterienfilters 17 G 5 auf 3.

Die *Tabelle 6* zeigt die erhaltenen Resultate. Für die festen Nährböden gilt: +++ gutes Wachstum, ++, + mäßig-schlechtes Wachstum, — kein Wachstum.

Tabelle 6

Einfluß der Thiazolvorstufen auf das Wachstum von *M. Ram.* Alter der Kulturen 30 Tage.
Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 6 Kulturen. Sp = Spuren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Asparagin, fl. NB.	Sp	112,3	Sp	Sp	Sp	94,1	110,1	Sp	Sp
Glykokoll	Sp	69,7	Sp	Sp	Sp	75,1	84,6	Sp	Sp
NH ₄ -Citrat.....	Sp	109,7	Sp	Sp	Sp	124,1	126,7	Sp	Sp
KNO ₃	Sp	75,1	Sp	Sp	Sp	63,1	64,3	Sp	Sp
Urea.....	Sp	48,7	Sp	Sp	Sp	63,2	49,8	Sp	Sp
Asparagin, feste NB..	—	+++	—	—	—	+++	+++	—	—
Glykokoll	—	+++	—	—	—	+++	+++	—	—
NH ₄ -Citrat	—	+++	—	—	—	+++	+++	—	—
KNO ₃	—	+++	—	—	—	+++	+++	—	—
Urea.....	—	+++	—	—	—	+++	+ +	—	—

Wir können somit behaupten, daß es *M. Ramannianus* auf keinem der von uns untersuchten Nährmedien gelingt, das Thiazol aus seinen Vorstufen zu synthetisieren. Unregelmäßig reagieren die Mischungen T + AP und T + CAP, auf einigen Nährmedien bewirken sie eine Steigerung (z. B. Citrat), auf andern eine Verminderung (KNO₃) des Wachstums.

3. Wachstumsversuche mit *Mucor Ram.* Möll. in Funktion der Zeit

Wohl von den wichtigsten Versuchen sind solche, die das Wachstum in Funktion der Zeit betrachten.

Die Mycelien werden nach verschiedenen Wachstumsperioden geerntet und gewogen. Jede Kultur enthält 5 γ B₁. Als Stickstoffquelle dient Asparagin.

Tabelle 7

Wachstum von *M. Ram.* in Funktion der Zeit. Mit Asparagin und 5 γ B₁ pro Kultur.

Tage	5	9	15	20	26	32	36
Gewicht in mg	7,9	12,5	48,8	77,8	117,1	152,3	186,7

Das Bild der Wachstumskurve in *Fig. 1* ist charakteristisch für *M. Ramannianus*. Bis zum 8./9. Tag ist das Wachstum gering. Vom 10. Tag an steigt die Kurve steil an, um erst nach mehr als 30 Tagen wieder zu verflachen. Wir werden später noch einmal darauf zurückkommen.

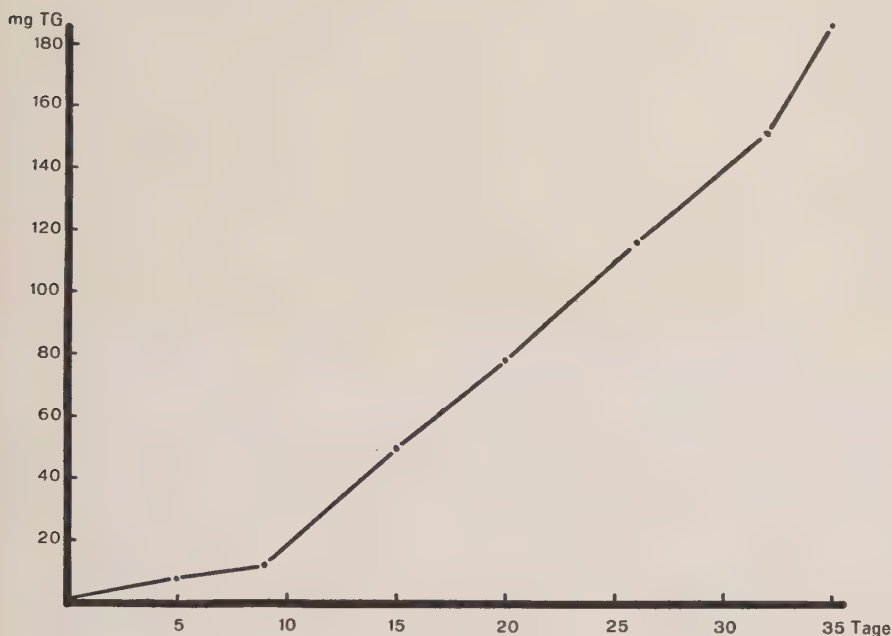


Fig. 1 Entwicklung von *Mucor Ramannianus* in Funktion der Zeit. Mit Asparagin 1‰ und 5 γ B₁ pro 25 ccm Nährlösung.
mg TG = Trockengewichte in Milligrammen.

III. Untersuchungen über die Varietät *Mucor Ram.* *Möller var. angulisporus* Naoumoff^(*)

I. Auxo-autotrophie von *M. Ram. Möll. angulisporus*

Es wird heute allgemein angenommen, daß der Bedarf eines Organismus für ein Vitamin auf den Verlust zurückzuführen ist, dieses Vitamin zu synthetisieren. Dies ist der Fall bei auxo-heterotrophen Mikroorganismen. Wie wir gesehen haben, synthetisiert *Mucor Ramannianus* Pyrimidin, benötigt hingegen Thiazol, wenn er gedeihen will.

^(*) der Einfachheit halber: *Mucor angulisporus*

Ein Organismus ist auxo-autotroph, wenn er befähigt ist, die ihm unentbehrlichen Wachstumsfaktoren selbst zu synthetisieren. Dies trifft zu bei den höhern Pflanzen. Aber auch unter den Mikroorganismen ist die Auxo-autotrophie verbreitet. Zwischen den beiden extremen Fällen gibt es alle möglichen Zwischenstufen, bei welchen die Synthesefähigkeit in vermindertem Maße vorhanden ist oder nur unter bestimmten Bedingungen funktioniert.

Schopfer hielt bereits fest (15), daß der Syntheseverlust und der daraus erfolgende Vitaminbedarf bei Organismen identisch ist, auch wenn sie voneinander systematisch verschieden sind. Dasselbe gilt auch für Species ein und derselben Familie. Es ist bekannt (15), daß zum Beispiel Mucorineen wie *M. Ramannianus*, *Abidia ramosa* und *Parasitella simplex* das Vitamin B₁ benötigen, daß aber gewisse Arten, wie *M. hiemalis*, *Abidia repens* für Vitamine autotroph sind.

Bild 1

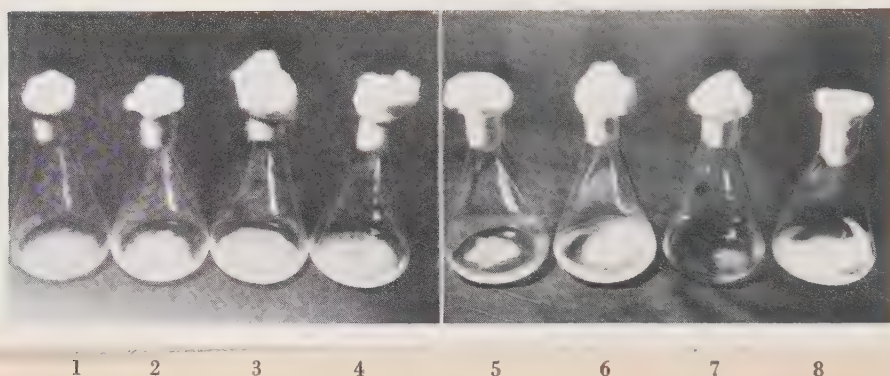


Bild 1 veranschaulicht Kulturen von *M. Ramannianus* und *M. angulisporus* auf flüssigen Nährmedien. Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat $\frac{1}{100}$ m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temperatur 19°.

Erklärungen:

- 1 Kontrolle von *M. Ramannianus* mit Asparagin
- 2 *M. Ramannianus* + optimale Menge B₁ mit Asparagin
- 3 Kontrolle von *M. Ram.* mit Citrat
- 4 *M. Ram.* + optimale Menge B₁ mit Citrat
- 5 Kontrolle von *M. angulisporus* mit Asparagin
- 6 *M. angulisporus* + optimale Menge B₁ mit Asparagin
- 7 Kontrolle von *M. ang.* mit Citrat
- 8 *M. ang.* + optimale Menge B₁ mit Citrat

Man beachte die schon im Bild gut sichtbaren Unterschiede der Asparagin- und Citratkulturen.

Aehnlich verhält es sich mit *Mucor Ramannianus* und einer Varietät, *M. Ram. angulisporus* Naoumoff. Diese beiden Mucorineen unterscheiden sich morphologisch nicht voneinander. Die von Naoumoff entdeckte Varietät besitzt im Gegensatz zu *M. Ramannianus* deutliche eckige Sporen (11). Das Bild 1 veranschaulicht Kulturen von *M. Ramannianus* und *M. Ram. angulisporus* auf flüssigen Nährböden (Erklärungen in der Legende). Zu beachten ist der auch im Bild gut sichtbare Unterschied zwischen Asparagin- und Citratkulturen.

In physiologischer Hinsicht dagegen unterscheiden sich die beiden Arten grundlegend. Während *Mucor Ramannianus*, wie wir gesehen haben, auxo-heterotroph ist gegenüber Aneurin oder dessen Komponente Thiazol, ist die Varietät für dieses Vitamin auxo-autotroph (3). (Siehe auch Fig. 2.).

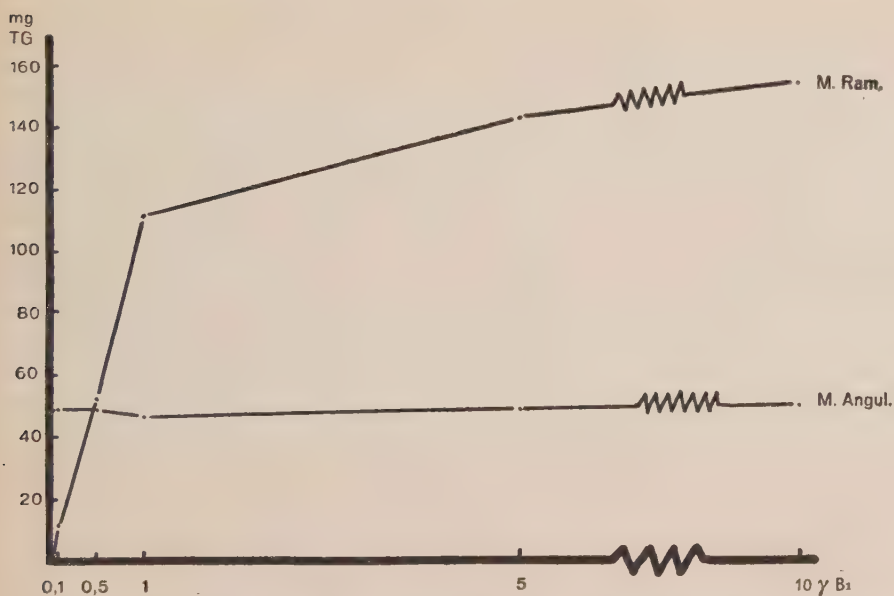


Fig. 2 Entwicklung von *Mucor angulisporus* und *Mucor Ramannianus* in Funktion des Aneurins (siehe auch Tab. 8).

M. Ram. = *Mucor Ramannianus*

M. angul. = *Mucor angulisporus*

mg TG = Trockengewichte in Milligrammen

Tabelle 8

Auxo-autotrophie von *M. Ram. angulisporus*. Mit Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°, Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. K = Kontrollen.

B ₁ in γ	K	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10
<i>M. Ramannianus</i>	0,8	3,3	5,2	11,3	52,5	111	142,2	153,7 mg
<i>M. Ram. angul.</i>	49,8	48,2	48,1	48,7	49,4	47,1	49,1	49,8 mg

Diese Ergebnisse, bestätigt durch viele Versuche, lassen die Auxo-autotrophie von *M. Ram. angulisporus* deutlich erkennen. Sie ist unabhängig von der Zusammensetzung der Nährlösung und scheint eine spezifische physiologische Eigenschaft der Varietät zu sein. Immerhin scheint diese Autotrophie nicht total zu sein, denn die mit *M. Ramannianus angulisporus* erhaltenen Trockengewichtswerte erreichen diejenigen von *M. Ramannianus* mit optimalem Aneurin nie. Wir müssen daher eher von einer partiellen Auxo-autotrophie sprechen. Es wird die Aufgabe der nächsten Kapitel sein, deren Grad ausfindig zu machen und zu bestimmen. Dies illustriert auch ein Versuch, ausgeführt in Funktion der Zeit. Vergleicht man *M. Ramannianus* mit seiner Varietät (siehe Fig. 3), so erkennt man folgende interessante Tatsache.

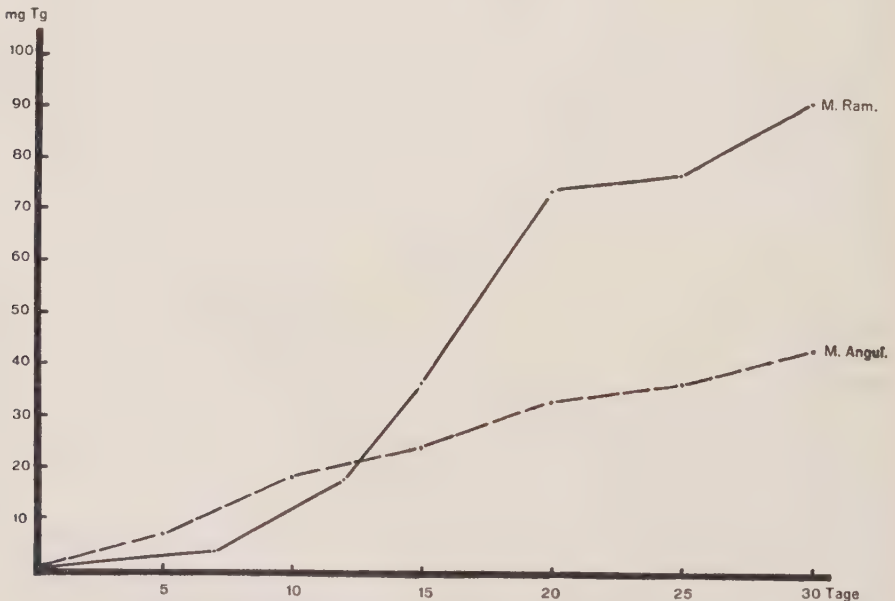


Fig. 3 Entwicklung von *Mucor Ramannianus* und *Mucor angulisporus* in Funktion der Zeit. Die Nährlösung enthält 1‰ Asparagin und jede Kultur 2,5 γ B₁ (siehe auch Tab. 9).

Abkürzungen siehe Fig. 2.

Tabelle 9

Zeitversuch mit *M. Ram.* und *M. Ram. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und 2,5 γ B₁ pro Kultur. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen.

Tage	6	7	10	12	15	20	25	30
<i>M. Ramannianus</i>	—	4,0	—	18,0	36,6	73,5	76,6	90,2 mg
<i>M. Ram. angul.</i>	7,0	—	18,4	—	24,3	32,9	36,6	42,9 mg

Die Entwicklung der beiden Organismen ist bis zum 10./12. Tag gleich, für *M. angulisporus* eher etwas höhere Werte. Am 12. Tag kreuzen sich beide Wachstumskurven. Diejenige von *M. Ramannianus* steigt nun steil an bis zum 20. Tag und verflacht ein wenig bis zum 30. Tag. Die Wachstumskurve von *M. angulisporus* dagegen steigt sehr langsam an, um bei 30 Tagen ein Trockengewicht zu erreichen, das mit *M. Ramannianus* bereits am 16. Tag des Wachstums erhalten wurde. Es scheint als ob *M. angulisporus* bis zum 12. Tag die zu seinem Aufbau nötigen Synthesen ausführen kann. Von diesem Tag an besitzt er den Mechanismus nicht mehr und kann mit dem mit einer optimalen Dosis B₁ wachsenden *M. Ramannianus* nicht Schritt halten.

Sehr aufschlußreich ist der nächste Zeit-Versuch, der wie folgt ange-
setzt wurde:

1. Versuchsreihe mit *M. angulisporus* ohne Aneurin
2. Versuchsreihe mit *M. angulisporus* + 2 ccm Weizenkeimextrakt 5 ‰
3. Versuchsreihe mit *M. Ramannianus* + 5 γ B₁
4. Versuchsreihe mit *M. Ramannianus* + 2 ccm Weizenkeimextrakt 5 ‰

Die auf Ammoniumcitrat gewachsenen Kulturen wurden nach Perioden von 8, 16 und 24 Tagen geerntet. Die sich daraus ergebenden Resultate sind in *Tabelle 10* und *Fig. 4* wiedergegeben.

Tabelle 10

Zeitversuch mit *M. Ram.* und *M. angul.* auf Ammoniumcitratmilieu. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 30—130 Kulturen.

Tage	8	16	24
<i>M. angulisporus</i> ohne B ₁	14,1	22,8	42,3 mg
<i>M. angulisp.</i> + 2 ccm Weizenk. E.	27,7	49,0	116,7 mg
<i>M. Ramannianus</i> + 5 γ B ₁	10,4	36,8	71,0 mg
<i>M. Ramannianus</i> + 2 ccm Wk. Extr.	15,6	42,5	107,0 mg

Die Wachstumskurven ohne Weizenkeimextrakt verlaufen so, wie wir es oben beschrieben haben. Die Kulturen mit Weizenkeimextrakt bieten aber ein ganz anderes Bild. Die Kurve von *M. Ramannianus* mit der optimalen Dosis B_1 und jene mit 2 ccm Weizenkeimextrakt laufen schön parallel bis zum 16. Tag, wobei erstere etwas niedrigere Trockengewichte gibt. Am 16. Tag trennen sich die Kurven, und *M. Ramannianus* erreicht Werte, wie man sie mit Aneurin oder Thiazol nie erreicht. Damit ist schön demonstriert, daß der Weizenkeimextrakt Stoffe enthält, die zusätzlich dem B_1 wirken und das Wachstum fördern, und zwar macht sich

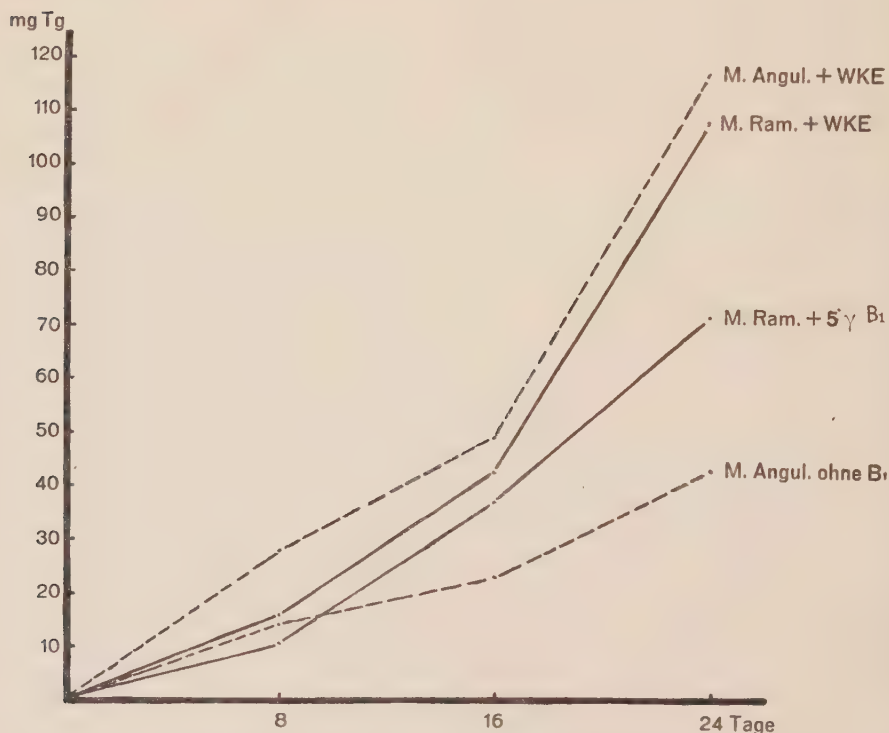


Fig. 4 Entwicklung von *Mucor Ramannianus* und *Mucor angulispurus* in Funktion der Zeit in Gegenwart von Aneurin und Weizenkeimextrakt 5 % (siehe Tab. 10).

- M. angul.* + WKE = Kultur von *Mucor angulispurus* mit 2 ccm Weizenkeimextrakt pro 25 ccm Nährlösung.
M. Ram. + WKE = Kultur von *Mucor Ramannianus* mit 2 ccm Weizenkeimextrakt pro 25 ccm Nährlösung.
M. Ram. + 5 γ B_1 = Kultur von *Mucor Ramannianus* mit 5 γ Aneurin pro 25 ccm Nährlösung.
M. angul. ohne B_1 = Kultur von *Mucor angulispurus* ohne Aneurin.
mg TG = Trockengewichte in mg.

dieser Effekt erst im spätern Wachstums-Stadium geltend, der merkwürdigerweise mit der Sporangienreife mehr oder weniger zusammenfällt. Man bekommt den Eindruck, daß *M. Ramannianus* von diesem Zeitpunkt an vom Weizenkeimextrakt Stoffe geliefert bekommt, die er entweder nicht mehr selber synthetisieren kann, infolge bestimmter Einflüsse (z. B. physico-chemische Aenderung des Milieus usw.), oder es handelt sich um einen oder mehrere Stoffe, die dem Aneurin zusätzlich wirken und die nach der Sporangienreife vom Organismus gebraucht werden.

Wie verhält es sich nun mit dem autotrophen *M. angulisporus*? Wie aus Fig. 4 ersichtlich, bewirkt ein Zusatz von Weizenkeimextrakt eine Wachstumssteigerung um das doppelte während den 16 ersten Tagen, um das dreifache nach 30 Tagen. Interessant ist die Tatsache, daß die beiden Weizenkeim-Kurven einen ganz ähnlichen Verlauf nehmen. Das will heißen, daß sich in Gegenwart von Weizenkeimextrakt die heterotrophe und autotrophe Art in physiologischer Hinsicht nähern. Beide erhalten vom Extrakt Substanzen, die sie zu einer Höchstentwicklung befähigen. Bei der heterotrophen Art tritt diese Wirkung erst im Laufe der Entwicklung auf, bei der autotrophen Art macht sie sich sofort bemerkbar.

Diese Ergebnisse veranlaßten uns, auf diese Tatsache näher einzugehen und dem Wuchsstoffbedarf von *M. angulisporus* auf die Spur zu kommen. Davon berichten Kapitel IV und V. Bevor wir aber dieses Kapitel abschließen, sei noch ein kurzer Blick auf die Symbiosefähigkeit unserer 2 *Mucor* Arten geworfen.

2. Symbiose zwischen *M. Ramannianus* Möller und *M. angulisporus* einerseits und *Rhodotorula rubra* anderseits

Nachdem nun feststeht (9), daß *M. Ramannianus* mit *Rhodotorula rubra* eine künstliche Symbiose eingeht, indem jeder Partner den ihm fehlenden Wirkstoff vom andern bezieht, lag es auf der Hand zu prüfen, ob die Varietät *M. angulisporus* ebenfalls als Symbiont aufzufassen ist.

Dieser Versuch wurde nach folgendem Plan angesetzt:

<i>M. Ramannianus</i>	B ₁ opt.	Asparaginemilieu (2,5 γ)	219,1 mg	1.
		Citratmilieu (5 γ)	200,8 mg	2.
	ohne B ₁	Asparaginemilieu	1,7 mg	3.
		Citratmilieu	0,5 mg	4.

<i>M. angulisporus</i>	B ₁ opt.	Asparaginmilieu (2,5 γ)	66,4 mg	5.
		Citratmilieu (5 γ)	104,2 mg	6.
	ohne B ₁	Asparaginmilieu	76,1 mg	7.
		Citratmilieu	110,0 mg	8.

Symbiose

<i>M. Ramannianus</i> + <i>Rhodot. r.</i>	Asparaginmilieu	191,4 mg	9.
	Citratmilieu	187,4 mg	10.

<i>M. angulisporus</i> + <i>Rhodot. r.</i>	Asparaginmilieu	35,8 mg	11.
	Citratmilieu	58,1 mg	12.

Dieser Versuch beweist einmal mehr die Symbiosefähigkeit der beiden Partner *M. Ramannianus* und *Rhodotorula rubra*. *M. Ramannianus* erreicht beinahe die Werte wie mit der optimalen Dosis B₁ während sich *Rhodotorula* maximal entwickelt. Neu ist hingegen das Verhalten von *M. angulisporus*. Es konnte vermutet werden, daß die Hefe von *M. angulisporus* in ihrem Wachstum günstig beeinflusst werden könnte, daß aber *M. angulisporus* dank seiner zumindest partiellen Autotrophie durch *Rhodotorula* in seinem Wachstum kaum gefördert würde. Unsere Hypothese konnte teilweise durch den Versuch bestätigt werden.

Nach 2 Tagen gemeinsamen Wachstums zeigten 9 und 10 (der Einfachheit halber beziehen wir uns auf die Zahlen in obigem Schema) noch kein Wachstum, wohl aber gedieh schon *M. angulisporus* in 11 und 12.

Nach 4 Tagen, Beginn eines Wachstums in den Kulturen 9, schwächer in 10, wobei *M. Ramannianus* sich stärker zu entwickeln scheint als *Rhodotorula*. *M. angulisporus* wuchs in 11 stärker als in 12. Für *Rhodotorula* gilt dasselbe, nur daß deren Entwicklung im Gegensatz zu *Mucor* viel schwächer ist.

Nach 6 Tagen findet man eine gute Entwicklung in Kultur 9 für *M. Ramannianus* und für *Rhodotorula*. Kultur 10 ist jetzt deutlich schwä-

cher. 11 und 12 zeigen weiterhin das Gedeihen von *M. angulisorus*, nicht aber jenes der Hefe, deren Entwicklung stationär zu sein scheint.

Nach 13 Tagen entwickeln sich 9 und 10 weiterhin gut, wobei 10 die Kultur 9 aufzuholen beginnt. Die Thalli von *M. angulisorus* in 11 und 12 haben das gleiche Aussehen wie die Kontrollen 7 und 8. *Rhodotorula* bleibt in ihrer Entwicklung zurück.

Nach 60 Tagen haben sich *M. Ramannianus* und *Rhodotorula* in 9 und 10 maximal entwickelt, und die Kulturen zeigen den von Müller (9) beschriebenen Aspekt. *M. angulisorus* zeigt ein stärkeres Wachstum in 12 als in 11. *Rhodotorula* ist nur an den Rändern der Mycelien gediehen und ist weit hinter der Entwicklung der Kulturen 9 und 10 geblieben.

Die Endresultate nach 68 Tagen sind im Schema (Seite 19/20) angegeben. Dieser Versuch läßt auf folgende Tatsachen schließen. Wie erwähnt, entwickelt sich *M. Ramannianus* beinahe so gut in Symbiose wie mit B₁ (1, 2, 9, 10). Ausnahmsweise sind die Werte mit Asparagin (1, 9) etwas höher als mit Citrat (2, 10). Da wir unsere Kulturen immer nach 30 Tagen ernten und in diesem Versuch nach 68 Tagen, so ist es nicht ausgeschlossen, daß die Asparagin-Kulturen nach dieser Zeitdauer die Citratkulturen wieder eingeholt haben.

Dagegen zeigt sich für *M. angulisorus* deutlich, daß das Ammonium-Citrat auf dessen Wachstum günstig wirkt (siehe auch Bild 1, S. 14). Die Citratkulturen (6, 8, 12) weisen im Durchschnitt rund 50 % höhere Werte auf gegenüber den Asparagin-Kulturen (5, 7, 11).

Das Hauptmerkmal muß sich aber auf das Ergebnis des Symbioseversuches von *M. angulisorus* im *Rhodotorula* richten. *M. angulisorus* braucht die Hefe zu seiner Entwicklung nicht. Im Gegenteil erhalten wir für *M. angulisorus* im Symbioseversuch (11, 12) tiefere Trockengewichte als mit den Kontrollen (7, 8). In Prozenten ausgedrückt, beträgt die Hemmung 52,9 % für die Asparagin- und 47,1 % für die Citratkulturen. Mit andern Worten, Thiazol (oder andere Stoffwechselprodukte) hemmen die Entwicklung von *M. angulisorus*, während sie *M. Ramannianus* fördern. Wir werden später mit dem reinen Thiazol sehen, daß diese Hemmung tatsächlich eintritt.

Wir wissen, daß *Rhodotorula* ohne Zusatz von Pyrimidin nicht wächst. Folglich ist das Wachstum von *Rhodotorula* im Symbioseversuch mit *M. angulisorus* auf die Tatsache zurückzuführen, daß *M. angulisorus* wie *M. Ramannianus* Pyrimidin synthetisiert. Da dieses Wachstum nur beschränkt ist, kann man annehmen, daß entweder die Pyrimidinsynthese von *M. angulisorus* gering ist und somit die Entwicklung von *Rhodotorula* zurückbleibt, oder daß von *M. angulisorus* Stoffe gleichzeitig gebildet werden, die auf die Entwicklung von *Rhodotorula* hemmend wirken.

Aus letzterem Versuch sich ergebende Ueberlegungen veranlaßten uns, folgendes zu prüfen:

Da die Thiazolbildende Hefe einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von *M. angulisporus* hat, haben wir vielleicht den gleichen oder gar den entgegengesetzten Einfluß, wenn wir im Symbioseversuch den Pyrimidinbildenden *M. Ramannianus* und *M. angulisporus* zusammen kultivieren. Was wir erhalten haben, ist in *Tabelle 11* niedergelegt:

Tabelle 11

Symbioseversuch von *M. ang.* und *M. Ram.* auf Citratmilieu. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Alter der Kulturen 30 Tage.

1. Kontrolle v. <i>M. Ramannianus</i>	1,9 mg
2. » v. <i>M. angulisporus</i>	65,1 mg
3. <i>M. Ram.</i> + 10 γ B ₁	75,2 mg
4. <i>M. angulisporus</i> + 10 γ B ₁	54,1 mg
5. <i>M. Ramannianus</i> + <i>M. angulisp</i> ...	66,5 mg
6. <i>M. Ram.</i> + <i>M. angul.</i> + 10 γ B ₁	66,1 mg

Wie man sieht und wie zu erwarten war, weisen die Kulturen mit gemeinsamer Beimpfung von *M. angulisporus* und *M. Ram.* keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen von *M. angul.* auf. Es war auch nicht anzunehmen, daß *M. Ramannianus* zum Wachsen käme, weil ihm der essentielle Wuchsstoff fehlen würde, es sei denn gewesen, *M. angulisporus* hätte Thiazol synthetisiert. Dem ist aber nicht so. Gibt man einer Kultur von *M. angulisporus* 10 γ B₁, so tritt eine deutliche Hemmung von —16,8 % ein. Gibt man aber einer Mischkultur von *M. angulisporus* und *M. Ramannianus* 10 γ B₁ zu, so erhalten wir praktisch die gleichen Werte wie mit den Kontrollen. Dieser Ausgleich ist wahrscheinlich auf ein Wachstum von *M. Ramannianus* zurückzuführen. Dieser Wert ist allerdings unterhalb demjenigen, erhalten mit *M. Ramannianus* + 10 γ B₁. Es sieht so aus, als ob die Gegenwart von *M. angulisporus* die Entwicklung von *M. Ramannianus* störe. Im Uebrigen ist es fast unmöglich, die Mycelien der beiden Organismen voneinander zu unterscheiden.

Diese Versuche besagen demnach nichts anderes, als daß *M. angulisporus* dank seiner Autotrophie auf *Rhodotorula* nicht angewiesen ist, und daß somit mit der Varietät von *M. Ramannianus* die künstliche Symbiose nicht zustande kommt. Wir treffen hier also den eigentümlichen Fall einer Varietät, deren Synthesevermögen verschieden ist ihrer Hauptart, einmal mehr ein Beweis, daß die Auxo-autotrophie unabhängig der systematischen Einordnung eines Organismus ist.

IV. Der Bedarf an Wachstumsfaktoren von *M. Ram. Möll. var. angulisporus*

Die Entdeckung der Auxo-autotrophie der Varietät *M. angulisporus* wirft verschiedene Fragen auf. Einmal kann man sich fragen, ob dieser Organismus vollständig autotroph ist, oder ob sich sein Wachstum durch Extrakte natürlicher Produkte fördern ließe. Darauf können wir eine positive Antwort geben, da wir vorher gesehen haben (siehe Seite 17), daß ein Extrakt aus Weizenkeimen stark fördernd auf das Wachstum von *M. angulisporus* ist. Diese Tatsache veranlaßte uns auch, die Wirkungen verschiedener pflanzlicher Extrakte zu untersuchen, die wir im nächsten Kapitel besprechen werden. Ein zweiter Weg wurde uns gewiesen durch das Nichtzustandekommen der Symbiose zwischen *M. angulisporus* und *Rhodotorula*. *M. angulisporus* braucht also Thiazol nicht. Aber vielleicht benötigt er einen andern unter den Vitaminen figurierenden Stoff. Dies führte uns ferner zur Untersuchung verschiedener Aminosäuren, und zuletzt prüften wir die Wirkung von Spurenelementen auf das Wachstum von *M. angulisporus*.

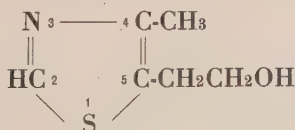
1. Wuchsstoffe

Nach Schopfer (15) ist ein Wachstumsfaktor vitaminischer Natur eine organische Substanz, dessen Bedarf vom Verlust seiner Synthesefähigkeit bestimmt ist, dessen Wirkung katalytisch, quantitativ und spezifisch ist. Diese Definition gilt für die im weitem untersuchten Substanzen.

Die Ergebnisse des Symbioseversuches von *M. angulisporus* + *Rhodotorula*, wo das von der Hefe synthetisierte Thiazol die Entwicklung von *M. angulisporus* hemmt, veranlaßten uns, diesen Effekt mit synthetischem Vitamin nachzuprüfen.

a) Thiazol

Das Thiazol ist die eine Komponente des Aneurins und essentieller Wachstumsfaktor für *M. Ramannianus*. Seine Formel lautet:



4-Methyl-5-β-Hydroxyäthyl-thiazol

Mengen von 0,1 γ, 1 γ, 10 γ und 20 γ wurden Asparagin- und Citrat-Kulturen beigegeben. Die aus 12 Kulturen erhaltenen Durchschnittswerte findet man in *Tabelle 12*.

Tabelle 12

Wirkung des Thiazols auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Temp. 19°. Alter der Kulturen 30 Tage. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. K=Kontrollen.

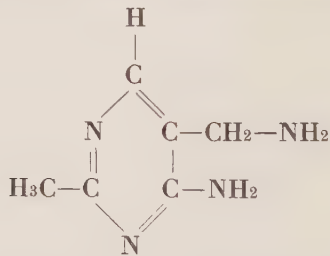
Thiazol in γ	0,1	1	10	20	K
Asparagimilieu	52,8 (−11,7 ‰)	60,7 (+1,5 ‰)	58,5 (−2,1 ‰)	68,1 (+13,9 ‰)	59,8 mg
Citratmilieu	61,1 (−13,8 ‰)	59,7 (−15,8 ‰)	62,1 (−12,4 ‰)	66,8 (−5,7 ‰)	70,9 mg

Die Zahlen in () geben die prozentualen Mehr- oder Minderwerte, die den Kontrollen gegenüber erreicht wurden.

Wie erwartet, hat Thiazol die Tendenz zur Hemmung des Wachstums von *M. angulisporus*, nur ist sie weniger ausgeprägt als im Symbioseversuch. Mit Asparagin scheint die Hemmung weniger fühlbar, 20 γ steigern sogar das Wachstum um 13,9 ‰. Die größte Hemmung haben wir auf Citratmilieu mit 1 γ Thiazol; sie beträgt −15,8 ‰. Ob die mit Aneurin beobachtete Wachstumshemmung auf das Thiazol zurückgeführt werden kann, ist nicht gesagt, denn nachfolgend wird gezeigt, daß auch das Pyrimidin eine inhibitorische Wirkung hat.

b) Pyrimidin

Pyrimidin, dessen Formel folgende Zusammensetzung hat



2-Methyl-4-amino-5-methylaminopyrimidin

ist die 2. Komponente des Aneurins und fördert die Entwicklung von *Rhodotorula rubra*. Wie wir gesehen haben, vermag *M. Ramannianus* das Pyrimidin aufzubauen, in geringem Maße ebenfalls *M. angulisporus* (siehe Seite 21). Daher war nicht zu erwarten, daß dieses Vitamin irgendeinen Einfluß auf die Entwicklung von *M. angulisporus* ausüben werde. Und tatsächlich konnte mit den von uns gebrauchten Konzentrationen nur in einem einzigen Fall eine Wachstumssteigerung erzielt werden, die zwar innerhalb der in biologischen Versuchen angenommenen Fehlergrenze

von $\pm 10\%$ liegt: mit 20 γ Pyrimidin auf Asparaginemilieu, + 6,9 %. Zufällig erhält man mit der gleichen Konzentration Thiazol auf demselben Milieu ebenfalls einen Zuwachs.

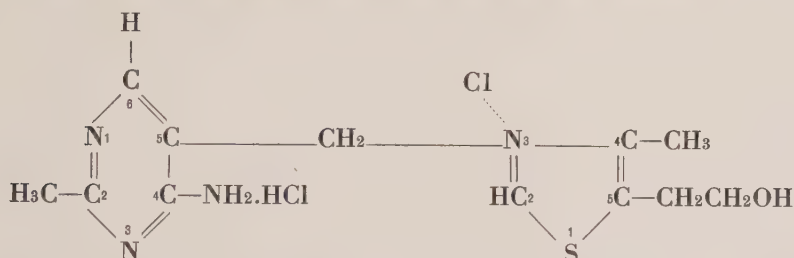
Tabelle 13

Wirkung des Pyrimidins auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 28 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

Pyrimidin in γ	K	0,1	1	10	20
Asparaginemilieu	51,8	48,8 (−5,5 ‰)	45,8 (−11,5 ‰)	46,2 (−10,8 ‰)	55,4 mg (+6,9 ‰)
Citratmilieu	71,8	67,8 (−5,5 ‰)	70,8 (−1,3 ‰)	60,6 (−15,4 ‰)	62,1 mg (−13,5 ‰)

c) Aneurin

Der Vollständigkeit halber sei nochmals auf die Wirkung des Aneurins hingewiesen, nachdem seine beiden Komponenten besprochen worden sind. Wie wir wissen, besteht das Aneurinmolekül aus Thiazol und Pyrimidin, miteinander durch eine Methylbrücke verbunden.



Wir haben bereits festgestellt, daß Aneurin auf *M. angulisporus* inhibitorisch wirkt.

Tabelle 14

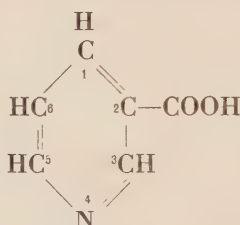
Wirkung des Aneurins auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

Aneurin in γ	K	0,01	5
Asparaginemilieu	70,1	56,0 (−20,1 ‰)	65,9 mg (−5,9 ‰)
Citratmilieu	81,3	74,1 (−8,8 ‰)	77,3 mg (−4,9 ‰)

Es steht also fest, daß sowohl Aneurin wie auch Pyrimidin und Thiazol das Wachstum von *M. angulisporus* nicht fördern, sondern es sogar zu hemmen vermögen.

d) Nikotinsäure

Es wurde nun geprüft, ob die zum B₂-Komplex gehörende Nikotinsäure als Wachstumsfaktor für *M. angulisporus* in Betracht käme. Dieses Vitamin ist in pflanzlichen und tierischen Geweben weit verbreitet und wirkt als Bestandteil eines Enzyms oder als Coenzym (15). Der Bedarf an Nikotinsäure für *Staphylococcus aureus* wurde von Knight (6) entdeckt. Ferner ist Nikotinsäure der einzige Faktor, der von *B. proteus* verlangt wird. Dieser Organismus kann deshalb als Test für das Antipellagravitamin dienen. Der Dysenteriebacillus benötigt diesen Faktor ebenfalls, und Mueller (7) fand, daß Nikotinsäure als zusätzlicher Wachstumsfaktor für *Corynebacterium diphtheriae* wirkt. Es gibt noch mehr Mikroorganismen, die auf Nikotinsäure oder dessen Amid ansprechen. Die Nikotinsäure, eine Pyridin-3-Carbonsäure, hat folgende Formel:



Sie wurde in unsern Versuchen in folgender Konzentration den Asparagin- und Citrat-Kulturen zugegeben: 0,1 γ, 1 γ, 10 γ 20 γ.

Tabelle 15

Wirkung der Nikotinsäure auf *M. angul.* Mit Asparagin 1‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

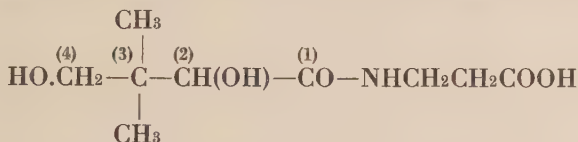
Nikotins. in γ	K	0,1	1	10	20
Asparaginemilieu	37,5	38,8 (+3,4 ‰)	37,8 (+0,8 ‰)	41,6 (+10,4 ‰)	39,8 mg (+6,1 ‰)
Citratmilieu	72,0	66,6 (-7,5 ‰)	70,1 (-2,6 ‰)	77,0 (+6,9 ‰)	82,2 mg (+14,1 ‰)

Die Nikotinsäure scheint auf das Wachstum von *M. angulisporus* weder einen hemmenden noch einen fördernden Einfluß auszuüben. Die Werte bewegen sich alle innerhalb der Fehlergrenze, wenn man vom

Wert mit 20 γ auf Citratmilieu absieht, der einer Förderung von 14,1 % gegenüber den Kontrollen gleichkommt.

e) Pantothersäure

Die Pantothersäure muß zu den Wachstumsfaktoren für gewisse Hefearten gezählt werden. Sie ist zusammengesetzt aus β -Alanin, dessen Wirkung auf die Hefe von Williams und Rohrmann bereits 1936 entdeckt wurde (16) und dem Lakton der 2-4-Dioxy-3-dimethyl-buttersäure:



2-4-Dioxy-3-dimethyl-butryl- β -Alanin

Sowohl auf Citrat- wie auf Asparaginemilieu bekommen wir einen Mehrzuwachs; relativ mehr auf ersterem, obwohl man auf letzterem den einzigen Wert erhält, der über der Fehlergrenze liegt, und zwar 14,1 %.

Tabelle 16

Wirkung der Pantothersäure auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen.

Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte gegenüber den Kontrollen (K).

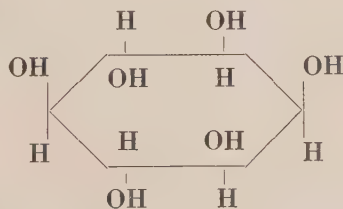
Pantothers. in γ	K	0,1	1	10	20
Asparaginemilieu .	37,5	38,1 (+1,6 ‰)	37,6 (+0,2 ‰)	42,8 (+14,1 ‰)	38,1 mg (+1,6 ‰)
Citratmilieu	72,0	78,8 (+9,4 ‰)	76,1 (+5,6 ‰)	78,8 (+9,4 ‰)	79,7 mg (-10,6 ‰)

Mit andern Worten: dies heißt, daß die Pantothersäure in den von uns gebrauchten Konzentrationen als Wachstumsfaktor für *M. angulispurus* nicht in Frage kommt.

Ein weiterer in der Reihe der Bios-Faktoren untersuchter Stoff war das

f) Inositol,

dessen Formel wie folgt lautet:



Seine Spezifität ist groß. Für eine andere Mucorinee, *Rhizopus suinus* Nielsen *, hat Schopfer (14) das Inositol als Wachstumsfaktor erkannt. Es vermag den negativen Einfluß des Aneurins zu kompensieren und dazu noch das Trockengewicht um 12,2⁰/₀ gegenüber den Kontrollen zu steigern. Dies erklärt, warum ein Weizenkeimextrakt, das B₁ enthält, auf *Rhizopus* trotzdem wachstumsfördernd wirkt, dank dem Vorhandensein von Inositol. Trotzdem kann Inositol allein den Weizenkeimextrakt nicht ersetzen.

Da wir für *M. angulisporus* die stark fördernde Wirkung eines Weizenkeimextraktes ebenfalls beobachtet haben, lag es nahe, die Wirkung des Inositols allein für diesen Organismus zu untersuchen. Wir konnten aber mit keiner der von uns verwendeten Konzentration einen solch fördernden Effekt erzielen, der uns veranlaßt hätte, die wachstumbedingende Eigenschaft des Weizenkeimextraktes auf das Inositol zurückzuführen. Wie Tabelle 17 zeigt, bedingt Inositol abwechselungsweise eine schwache Förderung und eine schwache Hemmung, unabhängig vom vorgelegten Milieu.

Tabelle 17

Wirkung des Inositols auf *M. angul.* Mit Asparagin 1⁰/₀₀ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

Inositol in γ	K	0,1	1	10	20
Asparaginemilieu	35,8	30,9 (-13,7 ⁰ / ₀)	40,5 (+13,1 ⁰ / ₀)	32,1 (-10,3 ⁰ / ₀)	32,9 mg (-8,1 ⁰ / ₀)
Citratmilieu	50,0	49,8 (-4,0 ⁰ / ₀)	52,9 (+5,8 ⁰ / ₀)	46,6 (-6,8 ⁰ / ₀)	53,3 mg (+6,6 ⁰ / ₀)

Man könnte natürlich einwenden, daß diese Ergebnisse keinen endgültigen Schluß zulassen, weil ja im allgemeinen das Inositol in starken Dosen wirksam ist, namentlich wenn man die äußerst schwachen Dosen berücksichtigt, die von üblichen Vitaminen verlangt werden. Nichtsdestoweniger glauben wir annehmen zu können, daß im Fall einer fördernden Wirkung des Inositols für *M. angulisporus*, sich diese bereits schon in geringen Konzentrationen bemerkbar machen würde, wie dies übrigens für *Rhizopus suinus* von Schopfer (14) schon beobachtet wurde. Die optimale Dosis befindet sich bei 200 γ pro 25 ccm Nährlösung, aber ein spürbarer Effekt ist bereits mit der Dosis 10 γ zu bemerken.

* *Rhizopus suinus* Nielsen = *Rhizopus Cohnii* Berl. et de Toni.

g) *Pimelinsäure*

Die Pimelinsäure als Wachstumsfaktor ist relativ noch wenig untersucht worden. Sie gilt als Co-Faktor für *Corynebacterium diphtheriae* (7). Eine Rolle spielt sie namentlich als Vorstufe für die Biosynthese des Biotins. Darüber wird im II. Teil eingehend berichtet. Es kann vorweggenommen werden, daß die Pimelinsäure mit unserer Versuchsanordnung als Wachstumsfaktor für *M. angulispurus* nicht in Frage kommt. Auf Citratmilieu beobachtet man durchwegs eine hemmende, auf Asparaginemilieu durchwegs eine fördernde Wirkung. Diese ist aber so gering, daß sie praktisch nicht ins Gewicht fällt.

Tabelle 18

Wirkung der Pimelinsäure auf *M. angul.* Mit Asparagin 1⁰/₀₀ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 29 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte gegenüber den Kontrollen (K).

Pimelinsäure in γ	K	20	100	2000
Asparaginemilieu	72,8	82,1 (+13 ⁰ / ₀)	78,6 (+8 ⁰ / ₀)	77,1 mg (+6 ⁰ / ₀)
Citratmilieu	72,9	70,0 (-4 ⁰ / ₀)	64,8 (-11 ⁰ / ₀)	67,9 mg (-7 ⁰ / ₀)

h) *Biotin, Desthiobiotin, d,l-ψ-Biotin*

Biotin ist für *Saccharomyces cerevisiae* essentieller Faktor und kann durch Desthiobiotin ersetzt werden, während d,l-ψ-Biotin auf diesen Organismus keine Wirkung besitzt. Was *M. angulispurus* anbetrifft, so war vorauszusehen, daß diese Vitamine auf das Wachstum keinen Einfluß haben würden. Denn theoretisch wird angenommen, daß ein von einem Mikroorganismus in genügender Menge synthetisierter Stoff von diesem nicht als exogener Wachstumsfaktor verlangt wird. Wir müssen uns stets vor Augen halten, daß ein Wuchsstoffbedürfnis auf den Verlust der Fähigkeit, ihn zu synthetisieren, zurückzuführen ist. Da *M. angulispurus* Biotin in großen Mengen synthetisiert, so ist die Wirkung dieses Vitamins als Wachstumsfaktor nicht anzunehmen. Dasselbe kann für die 2 andern untersuchten Biotine gesagt werden. Obschon sie kaum von *M. angulispurus* synthetisiert werden, sind es dem Biotin doch sehr ähnliche Stoffe, so daß deren Wirkung auf *M. angulispurus* sehr fraglich war. Unsere Hypothese bestätigte sich im großen und ganzen.

Tabelle 19

Wirkung von 3 Biotinen auf *M. angulisporus*. Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

Vitamin		Asparaginemilieu	Citratmilieu
Biotin	Kontr.	35,8 mg	50,0 mg
	0,1 m γ	30,4 mg (−5,4 ‰)	51,2 mg (+2,4 ‰)
	1 m γ	29,3 mg (−6,5 ‰)	58,5 mg (+17 ‰)
	10 m γ	42,7 mg (+6,7 ‰)	56,5 mg (+13 ‰)
	20 m γ	39,0 mg (+3,2 ‰)	52,9 mg (+5,8 ‰)
Desthio-Biotin	Kontr.	59,8 mg	70,9 mg
	0,1 m γ	49,1 mg (−18 ‰)	68,5 mg (−3,3 ‰)
	1 m γ	50,5 mg (−15,5 ‰)	68,6 mg (−3,2 ‰)
	10 m γ	47,5 mg (−23 ‰)	68,1 mg (−4 ‰)
	20 m γ	41,3 mg (−30 ‰)	70,0 mg (−1,2 ‰)
d, 1- ψ -Biotin	Kontr.	59,8 mg	70,9 mg
	0,1 m γ	69,0 mg (+15,4 ‰)	67,8 mg (−4,3 ‰)
	1 m γ	65,2 mg (+9 ‰)	70,1 mg (−1,1 ‰)
	10 m γ	61,4 mg (+2,6 ‰)	67,5 mg (−4,8 ‰)
	20 m γ	58,3 mg (−2,5 ‰)	71,9 mg (+1,4 ‰)

Einigermaßen erstaunen mag die Tatsache, daß auf Citratmilieu Mengen von 1 m γ und 10 m γ eine Förderung des Trockengewichtes von respektive + 17 ‰ und + 13 ‰ verursachen, während dieselben Konzentrationen auf Asparaginemilieu einmal schwach hemmend, einmal schwach fördernd wirken. Das Desthiobiotin hat mit jeder Konzentration auf beiden Nährlösungen inhibitorische Wirkung, wobei es auf Asparaginemilieu zu starken Wachstumshemmungen kommt, die mit 20 m γ − 30 ‰ erreichen. Das d,1- ψ -Biotin dagegen scheint das Asparagin vorzuziehen, mit dem es in 3 Fällen positiv wirkt.

Demnach steht also mit ziemlicher Sicherheit fest, daß keiner der von uns untersuchten Wachstumsfaktoren auf *M. angulisporus* eine annähernd dem Weizenkeimextrakt entsprechende Wirkung besitzt.

Wir verlassen deshalb das Gebiet der eigentlichen Wuchsstoffe, um zu dem der Aminosäuren überzugehen.

2. Aminosäuren

Es ist bekannt, daß Weizenkeime nicht nur reich an Wuchsstoffen, sondern nebst Spurenelementen, auch reich an Stickstoffquellen sind. Es ist nicht leicht, zwischen den beiden Funktionen, die die Aminosäuren zu

erfüllen haben, zu unterscheiden: Bausteine für Eiweiße und echte Wachstumsfaktoren (siehe auch II. Teil, Seite 77).

a) β -Alanin

Als erste Aminosäure wurde das als Co-Faktor für die Hefe identifizierte β -Alanin untersucht. Erstmals wurden Trockengewichtswerte erreicht, die mehr als 20 % über den Kontrollen stehen, und zwar mit den Konzentrationen von 10 γ und 20 γ auf Asparagimilieu.

Tabelle 20

Wirkung des β -Alanins auf *M. angulisporus*. Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

β -Alanin in γ	K	0,1	1	10	20
Asparagimilieu	51,8	44,0 (−15 ‰)	55,7 (+7,5 ‰)	63,6 (+22,7 ‰)	62,6 mg (+20,8 ‰)
Citratmilieu	71,8	64,3 (−10,4 ‰)	61,9 (−13,7 ‰)	62,5 (−12,9 ‰)	66,8 mg (−6,9 ‰)

Auf Citratmilieu dagegen hemmt β -Alanin ziemlich stark. Kein Zweifel, daß β -Alanin allein oft hemmend oder toxisch wirkt, daß es aber in Anwesenheit von andern Vitaminen und Asparagin aktiv wird (12). In unserm Fall haben wir nur Asparagin in der Nährlösung vorhanden. Dieses scheint aber schon zu genügen, um eine Zunahme der Trockengewichte zu bewirken. Die Ergebnisse veranlaßten uns, einen zweiten Versuch anzusetzen, in dem höhere Konzentrationen von β -Alanin gebraucht werden, da die meisten Aminosäuren, zwar mit Ausnahme eben des β -Alanins und des l-Leucins, in stärkeren Konzentrationen gebraucht werden müssen, bis sich eine Aktivität bemerkbar macht.

Tabelle 21

Wirkung höherer Konzentrationen von β -Alanin auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 31 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

β -Alanin in γ	K	20	100	500	1000
Asparagimilieu	79,7	86,2 (+8,1 ‰)	88,3 (+10,7 ‰)	69,9 (−12,2 ‰)	57,4 mg (−28 ‰)
Citratmilieu	83,1	85,8 (+3,2 ‰)	86,3 (+3,8 ‰)	66,8 (−19,6 ‰)	67,9 mg (−18,2 ‰)

Leider wurden unsere Erwartungen enttäuscht. 20 γ zeigen auch hier positive Wirkung, weniger ausgeprägt als im ersten Versuch; auch 100 γ sind positiv (auf beiden Milieus), 500 γ und 1000 γ dagegen auf beiden Milieus stark hemmend. Somit fällt diese Aminosäure als möglicher Wachstumsfaktor für *M. angulisporus* aus.

Ein anderer Aspekt des β -Alanins sei noch kurz erwähnt. Wir haben gesehen, daß β -Alanin eine Vorstufe der Pantothenensäure ist. Greifen wir auf Tabelle 16 zurück so ergibt sich folgendes Bild. Die Pantothenensäure, auf Citratmilieu, in den gleichen Konzentrationen gebraucht wie β -Alanin, ist fördernd, β -Alanin dagegen hemmend. Es scheint sich hier zu wiederholen, was wir oben gesagt haben: allein ist β -Alanin toxisch, im Molekülverband gekoppelt mit dem Buttersäurederivat aber scheint diese Toxizität aufgehoben.

b) Versuche mit Mischungen verschiedener Aminosäuren

Es gelangen 2 verschiedene Mischungen (siehe II. Teil, Seite 77) zur Untersuchung, A und B. Die Lösung wird so vorbereitet, daß man 1 mg pro ccm bekommt. Von dieser Lösung werden Mengen von 0,05 ccm bis 2 ccm den Kulturen beigegeben. Wenn wirklich Aminosäuren wachstumsfördernd auf *M. angulisporus* wirken, so müßte sich diese Wirkung mit Hilfe dieser Mischungen bemerkbar machen.

Tabelle 22

Wirkung von Mischungen versch. Aminosäuren auf *M. angulisporus*. Mit Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen.

Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

Aminosäuren- mischung in ccm	Kontr.	0,05	0,25	0,5	1	2
Mischung A	69,9	71,6 (+2,4 ‰)	71,7 (+2,5 ‰)	73,1 (+4,5 ‰)	72,4 (+3,5 ‰)	73,0 mg (+4,4 ‰)
Mischung B	49,1	50,0 (+1,8 ‰)	51,8 (+5,5 ‰)	50,5 (+2,8 ‰)	54,8 (+11,6 ‰)	55,1 mg (+15,4 ‰)

Die positiven Aenderungen, die man mit A erhält, liegen alle innerhalb der Fehlergrenze von ± 10 ‰. Dasselbe Bild mit B, nur daß Mengen von 1 ccm und 2 ccm das Trockengewicht gegenüber den Kontrollen um 11,6 ‰ und 15,4 ‰ steigern. Offenbar bewirkt eine Anreicherung des Milieus an assimilierbarem Stickstoff nicht eine dementsprechende Steigerung des Wachstums, wie dies von Schopfer für *Rhizopus* beobachtet wurde (14).

c) Schwefelhaltige Aminosäuren

Die im II. Teil (siehe Seite 79) besprochenen Versuche über den Einfluß der S-haltigen Aminosäuren auf die Biosynthese des Biotins brachten interessante Einzelheiten, das Verhalten des Wachstums von *M. angulisporus* betreffend, zum Vorschein.

Es kamen Cystein, Cystin und Methionin mit je 1 mg pro Kultur zur Prüfung. Es zeigte sich, daß von diesen 3 Aminosäuren einzig Methionin auf Asparaginmilieu eine stark positive Wirkung aufwies, von 33 % gegenüber den Kontrollen. Die andern Werte liegen innerhalb der Fehlergrenze oder wirken schwach hemmend und fördernd.

Das Bild ändert sich nicht bei Zugabe von Pimelinsäure, die, allein, negativ wirkt (siehe Seite 29); einzig die mit Methionin stark fördernde Wirkung wird auf 13,6 % reduziert. Das Verhalten von *M. angulisporus* weicht also von jenem von *Aspergillus niger* ab. Mit diesem Organismus haben Eakin & Eakin (4) beobachtet, daß Cystein und Cystin auf dessen Wachstum keinen Einfluß haben.

Wir können also sagen, daß keine der von uns untersuchten Aminosäuren die mit Weizenkeimextrakt beobachtete Wirkung erreicht. Im allgemeinen gibt die asparaginhaltige Nährlösung die höheren Trockengewichte, weil hier bereits eine Aminosäure vorhanden ist. Die beigegebenen Aminosäuren scheinen auf Citratmilieu eher zu hemmen.

3. Versuch mit einer Spurenelementmischung

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die im Weizenkeimextrakt enthaltenen Spurenelemente eine gewisse Rolle spielen müssen, umso mehr unser gewöhnliches Milieu keine speziellen Spurenelemente enthält.

Wir begnügten uns mit der Prüfung der von Berthelot vorgeschlagenen Spurenelementlösung (1, 5), die nachstehend angeführt sei:

Wasser	1000	ccm	Titansulfat	0,2	g
Eisensulfat	50	g	Zirkonsulfat	0,1	g
Mangansulfat	2	g	Kupfersulfat	0,05	g
Kaliumjodid	0,5	g	Berylliumsulfat	0,1	g
Nickelchlorid	0,05	g	Borsäure	0,05	g
Cobaltchlorid	0,05	g	Schwefelsäure, 60° Baumé	1	ccm

Diese Stammlösung wurde 5-, 25- und 100mal verdünnt. Je 1 Tropfen der unverdünnten und der verdünnten Lösung wurden zu 25 ccm Nährlösung gegeben. Das Resultat ersieht man in *Tabelle 24*.

Tabelle 24

Wirkung einer Spurenelementmischung nach Berthelot auf *M. angulisp.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 27 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte den Kontrollen (K) gegenüber.

Lösung	Kontr.	Lösg. normal	5 ×	25 ×	100 × verd.
Asparaginemilieu .	55,8	63,6 (+14 ‰)	83,6 (+48 ‰)	82,1 (+47,1 ‰)	68,9 mg (+23,5 ‰)
Citratmilieu	60,7	59,8 (-1,4 ‰)	57,6 (-5,1 ‰)	53,7 (-11,5 ‰)	57,9 mg (-4,6 ‰)

Eines fällt sofort auf: die Wirkung der Spurenelementlösung auf Citratmilieu ist in allen Konzentrationen negativ. Auf Asparaginemilieu dagegen stark positiv. Das Optimum ist erreicht mit den 5- und 25mal verdünnten Lösungen. Der Mehrwert gegenüber den Kontrollen beträgt 48 ‰. Dieser Unterschied in der Reaktionsweise je nach Verschiedenheit der Zusammensetzung des Milieus zeigt einmal mehr, wie vorsichtig man in der Interpretierung von biologischen Versuchen sein muß.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß weder Vitamine, noch Aminosäuren, noch Spurenelemente, die von uns untersucht wurden, einen wachstumsfördernden Effekt auf *M. angulisporus* aufweisen, der demjenigen mit Weizenkeimextrakt gleichkommt.

Im nächsten Kapitel soll deshalb gezeigt werden, ob diese Wachstumsförderung einzig mit Weizenkeimextrakt erreicht wird, oder ob andere Extrakte aus natürlichen Produkten denselben Effekt erzielen.

V. Extrakte aus natürlichen Produkten als Quelle für Wachstumsfaktoren für *M. Ram. Möll. var. angulisporus*

I. Hefe, Weizenkeime, Bierwürze

Auf die wachstumsfördernde Wirkung eines Weizenkeimextraktes wurde schon mehrmals hingewiesen. Es soll nun in diesem Kapitel geprüft werden, wie es sich mit andern Extrakten verhält.

Die wachstumsfördernde Wirkung einer 0,5 %igen Peptonlösung ist schon für *M. Ramannianus* festgestellt worden (siehe Seite 8), ferner ist bekannt, daß Bierwürze und Hefe-Extrakte stark wirkstoffhaltig sind.

In einem Vorversuch wurden diese 3 Stoffe geprüft. In folgender Tabelle sind die prozentualen Mehrwerte gegenüber den Kontrollen angegeben:

Tabelle 25

Wirkung versch. Extrakte auf *M. angulisporus*. Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 21 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 6 Kulturen. Prozentuale Mehrwerte den Kontrollen gegenüber.

	Asparaginmilieu	Citratmilieu
1 ccm Hefe-Extrakt 5 ‰	284 ‰	75,1 ‰
1 ccm Peptonlösg. 0,5 ‰	123 ‰	5,2 ‰
1 ccm Bierwürze	306 ‰	62,2 ‰

Die stark positive Wirkung dieser 3 Stoffe auf das Wachstum von *M. angulisporus* ist damit erwiesen. Sie ist viel ausgeprägter mit Asparagin als mit Ammoniumcitrat.

Diese Ergebnisse veranlaßten uns, folgende Versuche zu unternehmen. Je 0,1 ccm, 0,5 ccm, 1 ccm und 2 ccm von Bierwürze, eines 5 %igen Weizenkeimextraktes und eines 5 %igen Hefe-Extraktes wurden 25 ccm Citrat- und Asparagin-Nährlösung beigegeben. Dieselben Mengen werden mit 3 %igem Carbo adsorbens (Carbo Medicinalis Siegfried) behandelt und ebenfalls den Kulturen verabreicht.

Tabelle 26

Wirkung von Bierwürze, Hefe- und Weizenkeimextrakten auf *M. angul.* Mit Asparagin 1^{0/00} und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 27 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehrwerte den Kontrollen gegenüber.
 unbeh. = Extrakte mit Carbo ads. nicht behandelt. beh. = Extr. mit Carbo ads. behandelt.

	Asparaginemilieu	Citratmilieu
Bierwürze		
Kontr.	56,2 mg	61,6 mg
0,1 ccm unbeh.	64,0 mg (+13,8 ^{0/0})	65,1 mg (+5,6 ^{0/0})
0,5 ccm »	85,1 mg (+51,4 ^{0/0})	76,0 mg (+23,3 ^{0/0})
1 ccm »	98,8 mg (+75,8 ^{0/0})	85,8 mg (+39,2 ^{0/0})
2 ccm »	137,2 mg (+144,1 ^{0/0})	110,5 mg (+79,3 ^{0/0})
0,1 ccm beh.	69,2 mg (+23,1 ^{0/0})	64,7 mg (+5 ^{0/0})
0,5 ccm »	72,4 mg (+28,9 ^{0/0})	69,3 mg (+12,5 ^{0/0})
1 ccm »	74,6 mg (+32,7 ^{0/0})	71,7 mg (+16,3 ^{0/0})
2 ccm »	85,7 mg (+52,3 ^{0/0})	80,4 mg (+30,5 ^{0/0})
Hefe-Extrakt		
Kontr.	50,5 mg	66,5 mg
0,1 ccm unbeh.	71,6 mg (+41,8 ^{0/0})	68,8 mg (+3,4 ^{0/0})
0,5 ccm »	104,5 mg (+107 ^{0/0})	81,8 mg (+23 ^{0/0})
1 ccm »	121,7 mg (+141 ^{0/0})	88,3 mg (+32,8 ^{0/0})
2 ccm »	149,7 mg (+179 ^{0/0})	118,0 mg (+77,4 ^{0/0})
0,1 ccm beh.	65,2 mg (+29,1 ^{0/0})	75,2 mg (+13 ^{0/0})
0,5 ccm »	76,0 mg (+50,5 ^{0/0})	77,3 mg (+15,8 ^{0/0})
1 ccm »	80,7 mg (+59,8 ^{0/0})	81,4 mg (+22,4 ^{0/0})
2 ccm »	80,5 mg (+59,4 ^{0/0})	74,8 mg (+12,5 ^{0/0})
Weizenkeim-Extrakt		
Kontr.	53,5 mg	83,9 mg
0,1 ccm unbeh.	87,3 mg (+63,2 ^{0/0})	98,4 mg (+17,3 ^{0/0})
0,5 ccm »	125,8 mg (+135 ^{0/0})	127,5 mg (+52 ^{0/0})
1 ccm »	138,7 mg (+159,2 ^{0/0})	144,5 mg (+72,2 ^{0/0})
2 ccm »	152,9 mg (+185,8 ^{0/0})	145,0 mg (+72,8 ^{0/0})
0,1 ccm beh.	77,6 mg (+45 ^{0/0})	92,5 mg (+10,3 ^{0/0})
0,5 ccm »	122,5 mg (+129 ^{0/0})	111,3 mg (+32,7 ^{0/0})
1 ccm »	142,7 mg (+166,8 ^{0/0})	116,0 mg (+38,3 ^{0/0})
2 ccm »	138,9 mg (+159,7 ^{0/0})	114,5 mg (+36,5 ^{0/0})

Für diese 3 Stoffe gilt, daß die Wachstumsförderung proportional der Zugabe des Extraktes ist, unabhängig vom Milieu. Etwas weniger ausgeprägt wirken die behandelten Extrakte. Typisch ist auch die Tatsache, daß die positive Wirkung der Extrakte auf Asparaginmilieu viel deutlicher zum Vorschein kommt, ja sie wird sogar auf Citratmilieu stationär mit 1 ccm und 2 ccm Weizenkeimextrakt. Anders ausgedrückt, vermag *M. angulisporus* auf Citratmilieu nicht die ihm vorgelegten zusätzlichen wachstumsfördernden Stoffe, die im natürlichen Produkt vorhanden zu sein scheinen, zu verwerten, obschon die Kontrollen durchwegs auf Citratmilieu höhere Trockengewichte liefern.

Den besten Vergleich geben sicher die in Prozenten ausgedrückten, den Kontrollen gegenüber erzielten Mehrwerte, die in Fig. 5 gezeigt werden.

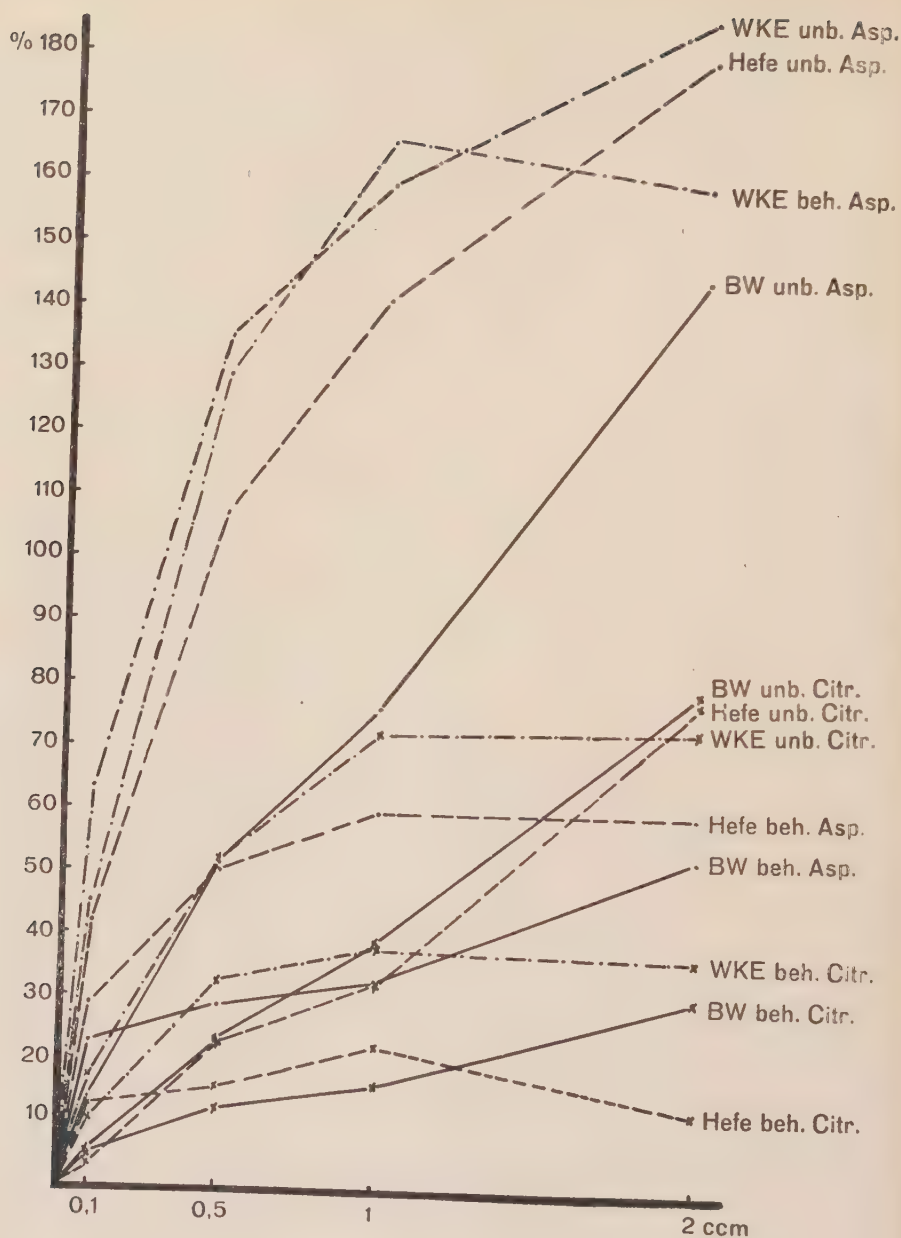
Frappant ist die Tatsache, daß die Kurven des behandelten und unbehandelten Weizenkeimextraktes auf Asparaginmilieu sich decken, während dies nicht der Fall ist auf Citratmilieu.

Weder für den Hefe-Extrakt, noch für die Bierwürze findet man den gleichen Fall. Die Kurven der behandelten Extrakte sind hier stets tiefer als die der nichtbehandelten, und zwar rund um die Hälfte. Das will besagen, daß für den Hefe-Extrakt und für die Bierwürze der wachstumsfördernde Effekt möglicherweise auf 2 Faktoren zurückzuführen ist: ein Faktor, der von der Kohle absorbiert wurde, und ein 2. Faktor, der die Kohle passiert. Im Fall des Weizenkeimextraktes könnte man folgende Erklärung finden: da wir stets nicht-entfetteten Weizenkeimextrakt gebrauchen, ist es möglich, daß der adsorbierbare Faktor so gebunden ist, daß er von der Kohle nicht adsorbiert wird.

Ferner fällt auf, daß mit kleinen Mengen des zugegebenen behandelten und unbehandelten Extraktes von Hefe und Bierwürze, die Kurven nahe beieinander liegen, in 3 Fällen ist sogar die Kurve des behandelten über derjenigen des unbehandelten Extraktes. Erst mit größeren Mengen von Extrakt trennen sich beide Kurven. Es sieht ganz darnach aus, als ob gewisse Substanzen sich im behandelten Extrakt befänden, die in schwacher Konzentration fördern, in starker Konzentration diese Förderung aber verlieren. In diesem Zeitpunkt müßte der adsorbierbare Faktor eingreifen. Ist diese Hypothese richtig, müßten Eluat + behandelter Extrakt die volle Wirkung des unbehandelten Extraktes geben.

Dieser Gedankengang war wegleitend für folgenden Versuch: *M. angulisporus* und *M. Ramannianus* werden auf Bierwürze und Hefe-Extrakt, behandelt und unbehandelt, kultiviert. In einer Serie wird dem behandelten Extrakt eine supraoptimale Dosis B_1 verabfolgt, nach folgendem Schema:

1. Kontrollen
2. $5 \gamma B_1$ pro Kultur ($2,5 \gamma$ mit Asparagin)
3. Bierwürze, Hefe-Extrakt, unbehandelt, 1 ccm / 25 ccm Nährlösung
4. Bierwürze, Hefe-Extrakt, unbehandelt, $5 \text{ ccm} / 25 \text{ ccm}$ Nährlösung



5. Bierwürze, Hefe-Extrakt, behandelt, 1 ccm / 25 ccm Nährlösung
6. Bierwürze, Hefe-Extrakt, behandelt, 5 ccm / 25 ccm Nährlösung
7. Bierwürze, Hefe-Extrakt, behandelt, 1 ccm + 10 γ B₁
(5 γ mit Asparagin)
8. Bierwürze, Hefe-Extrakt, behandelt, 5 ccm + 10 γ B₁
(5 γ mit Asparagin)

Tabelle 27

Wirkung von Bierwürze auf *M. angulisporus*. Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte gegenüber den Kontrollen in Prozenten.

Numerierrg. entsprechend Schema S. 37	1	2	3	4	5	6	7	8
Aspa. milieu	40,1	39,5 (-1,5)	108,1 (+170)	274,2 (+584)	92,0 (+81,7)	186,6 (+365,4)	103,1 (+157)	223,2 mg (+457)‰
Citratmilieu	81,2	79,7 (-1,8)	111,6 (+37,4)	200,6 (+147)	94,6 (+16,5)	134,4 (+65,5)	105,4 (+29,8)	159,5 mg (+96,4)‰

Einmal bestätigt sich die Autotrophie von *M. angulisporus* dem Anurin gegenüber. Ein Zusatz von 1 ccm unbehandelter Bierwürze zu 25 ccm Asparaginemilieu bewirkt schon eine Wachstumssteigerung von 170 ‰, 5 ccm eine solche von 584 ‰. Die entsprechenden Werte für Citrat sind 37,4 ‰ und 147 ‰, also bedeutend tiefer (siehe auch Fig. 6).

Schon 1 ccm der mit Carbo med. behandelten Bierwürze weist auf Asparaginemilieu einen Mehrzuwachs gegenüber den Kontrollen von 81,7 ‰, 5 ccm einen solchen von 365,4 ‰. Auch hier sind die Citratwerte tiefer. Wie wir vorhin schon gesehen haben, ist die behandelte Bierwürze allein schon fähig, das Wachstum von *M. angulisporus* um ein mehrfaches zu fördern. Interessant wird es aber, wenn wir diesem behandelten Extrakt eine supraoptimale Dosis B₁ zugeben. Diese Zugabe fördert ihrerseits das Wachstum von *M. angulisporus*, ohne jedoch die Werte der unbehandelten Bierwürze zu erreichen. Wir stehen also vor der Tat-

Fig. 5 Entwicklung von *Mucor angulisporus* ausgedrückt in ‰ bezogen auf die Kontrollen, in Gegenwart von steigenden Mengen von Weizenkeimextrakt 5 ‰; Bierwürze und Hefe-Extrakt 5 ‰ auf 2 verschiedenen Nährlösungen (siehe Tab. 26).

WKE = Weizenkeimextrakt 5 ‰

Hefe = Hefe-Extrakt 5 ‰

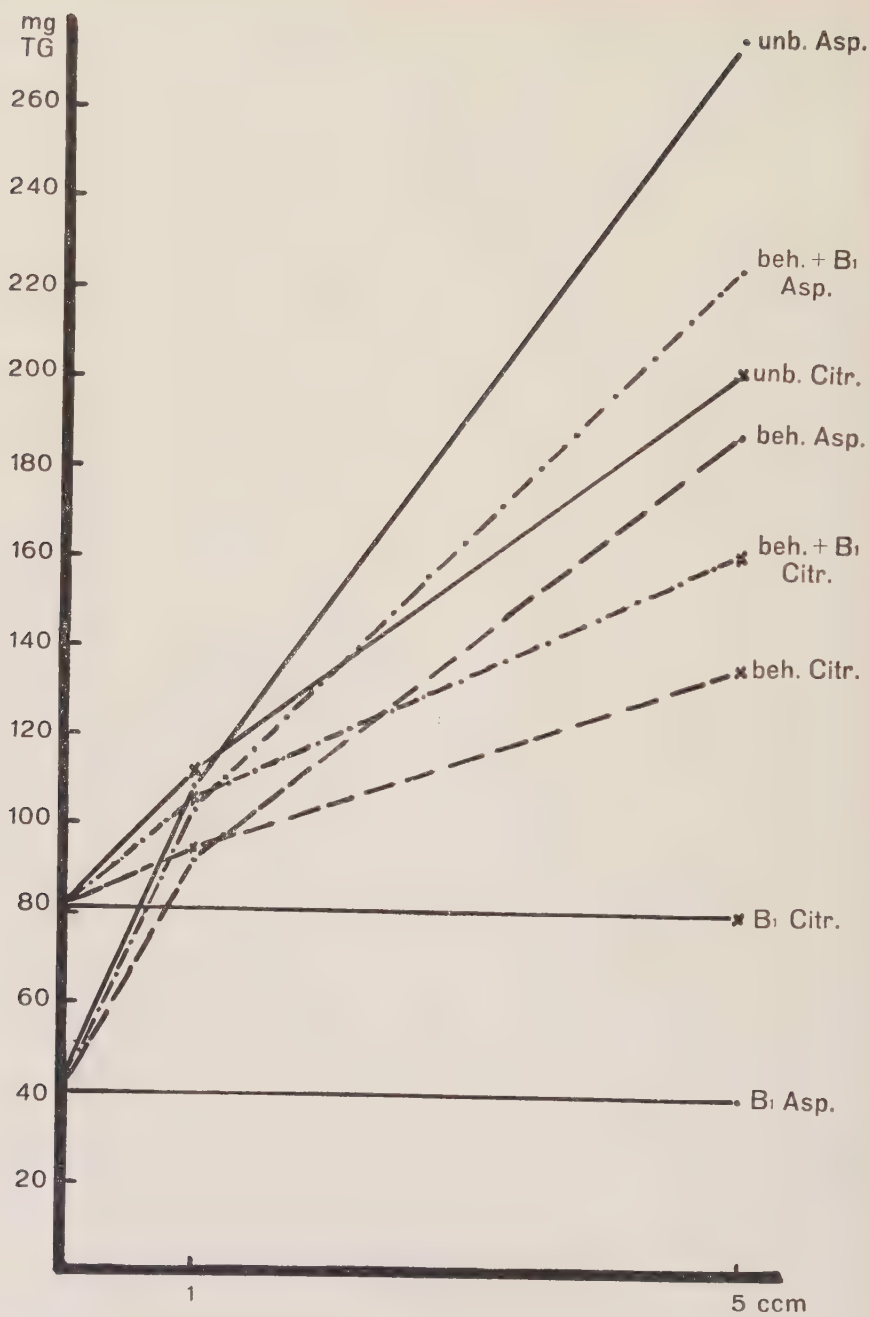
BW = Bierwürze

unb. = nicht mit Carbo adsorbens 3 ‰ behandelt

beh. = mit Carbo adsorbens 3 ‰ behandelt

Citr. = Milieu mit Ammoniumcitrat

Asp. = Milieu mit Asparagin



sache, daß Aneurin die Entwicklung von *M. angulisporus* hemmt, daß es aber, der mit Kohle behandelten Bierwürze in supraoptimalen Mengen zugegeben, auf die Entwicklung von *M. angulisporus* einen positiven Einfluß hat. Gegenüber den Werten von 1 ccm behandelter Bierwürze betragen die Mehrwerte bei Zugabe von B₁ 12,0 % für Asparagin- und 11,6 % für Citratmilieu. Gegenüber den Werten von 5 ccm behandelter Bierwürze 19,7 % und 18,6 %. Also doch immerhin Förderungen, wie wir sie mit B₁ allein nie beobachtet haben. Bei Betrachtung von Fig. 6, erkennt man wiederum, daß bei schwachen Konzentrationen die Wachstumskurven beieinander liegen. Namentlich die Kurve Bierwürze + B₁ liegt bei der Konzentration von 1 ccm noch ganz nahe an der Kurve der unbehandelten Bierwürze. Erst bei größeren Mengen trennen sie sich. Dies könnte bedeuten, daß in kleinen Mengen der Verlust der wachstumsfördernden Wirkung durch das B₁ wettgemacht werden könnte. Die höheren Trockengewichtswerte, die man mit der unbehandelten Bierwürze bekommt, wenn diese in größeren Mengen beigegeben wird, könnte auf den vermuteten 2. Faktor zurückführbar sein (siehe Seite 37).

Tabelle 28

Wirkung von Hefe-Extrakt 5 % auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 27 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte gegenüber den Kontrollen in Prozenten.

Numeriery. entspre- chend Schema S. 37	1	2	3	4	5	6	7	8
Aspa. milieu	38,5	35,8 (-7)	118,7 (+208)	227,5 (+491)	64,5 (+67,5)	74,7 (+94)	59,9 (+55,6)	62,7 mg (+62,9) %
Citratmilieu	58,0	63,2 (+8,9)	91,5 (+57,8)	199,2 (+243,4)	76,1 (+31,2)	56,1 (-3,2)	61,6 (+6,2)	54,3 mg (-6,3) %

M. angulisporus mit Hefe kultiviert bietet ein anderes Bild (siehe Fig. 7). Starke Förderung des Wachstums auf Asparaginmilieu (491 %) und Citratmilieu (243,4 %), die proportional der zugegebenen Menge Hefe-Extrakt zunimmt. Der behandelte Extrakt hat nicht die Wirkung der behandelten Bierwürze. Auf Citratmilieu wirkt er mit 5 ccm sogar hem-

Fig. 6 Entwicklung von *Mucor angulisporus* in Gegenwart von steigenden Mengen von Bierwürze auf 2 verschiedenen Nährlösungen (siehe Tab. 27).

unb.
beh.
Asp.
Cit.
B₁

=
=
=
=
=

}

siehe Fig. 5

2,5 γ pro 25 ccm Milieu, mit Asparagin
5,0 γ pro 25 ccm Milieu, mit Ammoniumcitrat

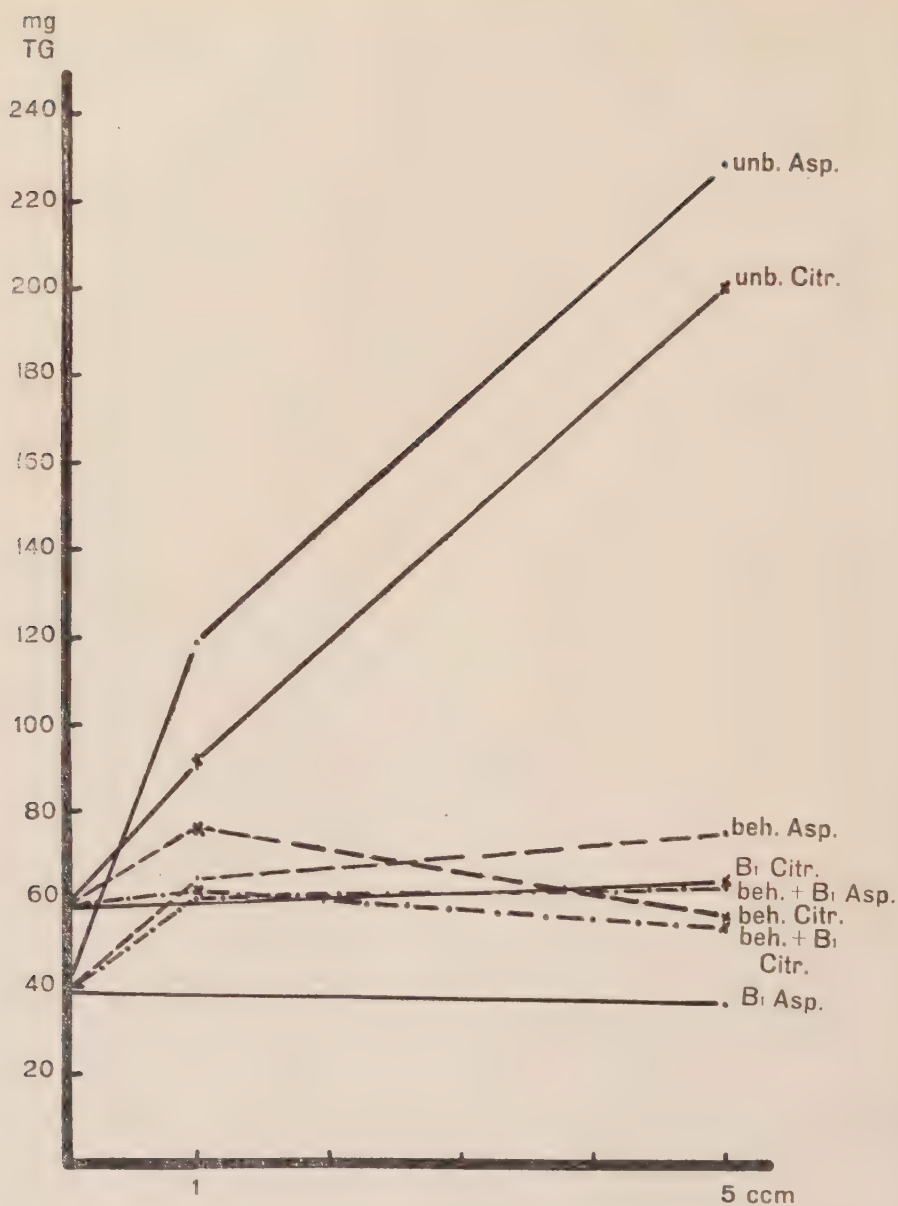


Fig. 7 Entwicklung von *Mucor angulisporus* in Gegenwart von steigenden Mengen von Hefe-Extrakt 5% auf 2 verschiedenen Nährlösungen (siehe Tab. 28).
Abkürzungen = siehe Fig. 5 und 6.

mend. Eine Zugabe von Aneurin zum behandelten Extrakt vermag auf Asparaginemilieu das Wachstum von *M. angulisporus* um 55,6 % mit 1 ccm Extrakt und um 62,9 % mit 5 ccm Extrakt zu steigern. Die Werte liegen unterhalb denjenigen des behandelten Extraktes. Auf Citratmilieu bewirkt das zusätzliche B₁ eine Hemmung des Wachstums. Es ist also ein großer Unterschied im Verhalten der beiden vorgelegten natürlichen Extrakte. In beiden Fällen starke wachstumsfördernde Wirkung der unbehandelten Extrakte. Die behandelte Bierwürze weist noch eine große Fähigkeit auf, das Wachstum von *M. angulisporus* zu fördern, die gesteigert wird durch Zugabe von optimalem Aneurin. Der behandelte Hefe-Extrakt, zuerst positiv wirkend, verliert diese Wirkung bei größeren Extraktzugaben. Das zugegebene B₁ erzielt nur auf Asparaginemilieu einen positiven Effekt.

Tabelle 29

Wirkung von Bierwürze auf *M. Ramannianus*. Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte in Prozenten den Aneurin-Kulturen gegenüber. Sp = Spuren

Numerierrg. entsprechend Schema S. 37	1	2	3	4	5	6	7	8
Aspa. milieu	1,4	118,7	179,0 (+50,8)	294,1 (+147,7)	39,7 (-66,5)	84,4 (-28,5)	157,1 (+32,3)	252,3 mg (+112,6) ⁰ / ₀
Citratmilieu	Sp.	97,2	113,0 (+16,3)	185,2 (+90,5)	4,6 (-95,3)	26,0 (-73,2)	114,1 (+17,4)	227,8 mg (+134,3) ⁰ / ₀

Wie verhält sich nun in der gleichen Versuchsanordnung der auxo-heterotrophe *M. Ramannianus*. Die Resultate entsprechen ganz gut unseren Erwartungen. Die unbehandelte Bierwürze fördert auf beiden Milieus die Entwicklung von *M. Ramannianus* (siehe auch Fig. 8 und Tab. 29). Schon 1 ccm Bierwürze bewirkt einen Mehrzuwachs von 16,3 % mit Citrat und 50,8 % mit Asparagin gegenüber den optimalen Aneurinwerten. Es müssen also auch für *M. Ramannianus* Stoffe in der Bierwürze existieren, die dessen Entwicklung zusätzlich dem Aneurin günstig beeinflussen. Wird die Bierwürze mit Carbo med. behandelt, so beobachtet man, daß sie das Wachstum von *M. Ramannianus* zu beeinflussen vermag. Entweder wurde nicht alles B₁ absorbiert oder es handelt sich möglicherweise um die Wirkung von Spurenelementen.

Ein Zusatz von optimalem B₁ zu der behandelten Bierwürze bedingt die initiale Wirkung der unbehandelten Bierwürze, wenigstens ist dies streng gültig für die zugegebene Bierwürzenmenge von 1 ccm, wo beide Kurven sich schön decken. Für größere Extraktmengen trennen sich die Kurven, wie wenn hier dem B₁ zusätzliche Stoffe wirksam wären.

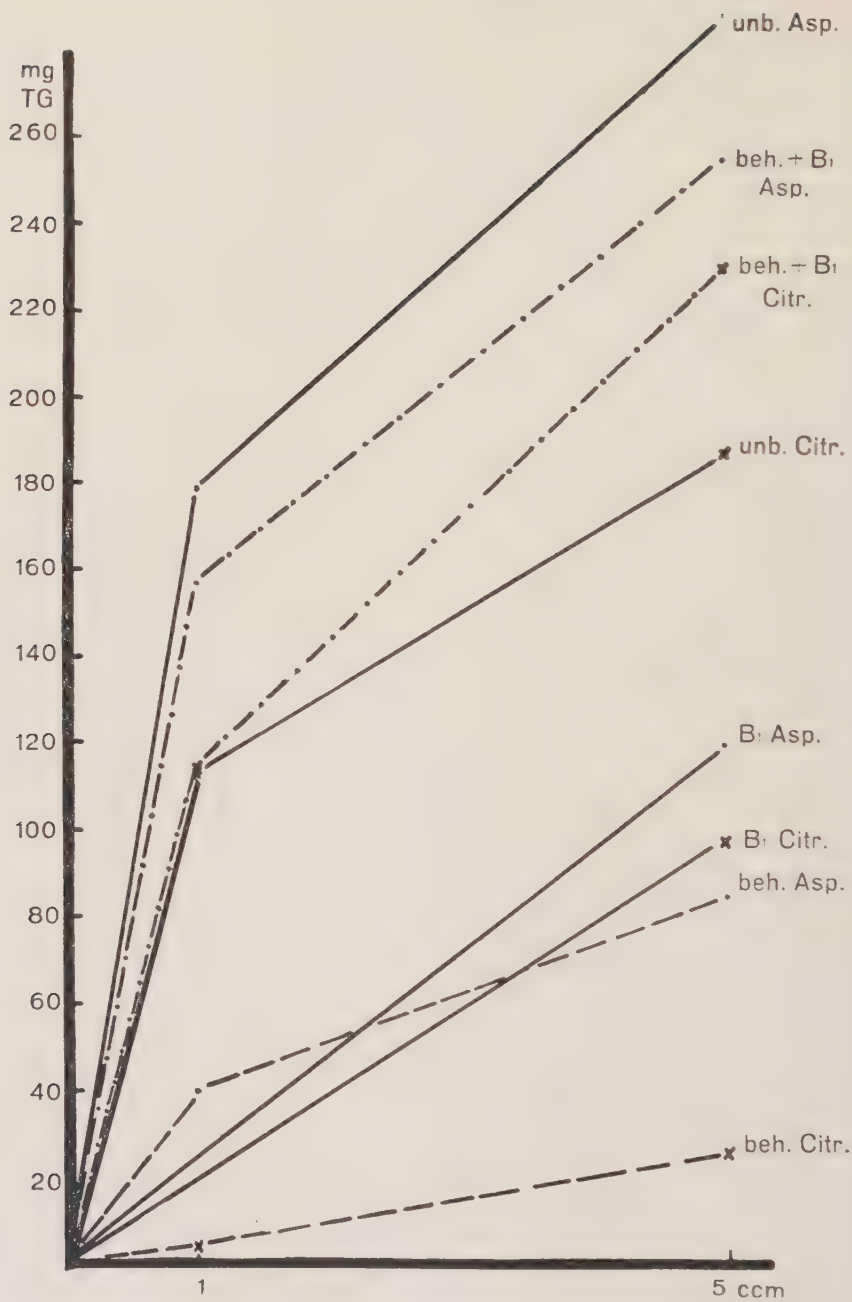


Tabelle 30

Wirkung von Hefe-Extrakt auf *M. Ramannianus*. Mit Asparagin 1‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 25 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte in Prozenten bezogen auf die Aneurinwerte.

Numerierg. entsprechend Schema S. 37	1	2	3	4	5	6	7	8
Aspa. milieu	0,9	82,2	119,9 (+45,9)	200,5 (+143,9)	82,3 —	146,6 (+78,3)	120,5 (+47,2)	151,1 mg (+83,8)‰
Citratmilieu	1,2	87,0	137,0 (+58,5)	195,4 (+124,6)	22,5 (-74,2)	97,8 (+12,4)	100,0 (+14,9)	142,6 mg (+63,9)‰

Der unbehandelte Hefe-Extrakt scheint auf beiden Milieus gleich gut zu wirken (siehe auch Fig. 9 und Tab. 30). Der mit Kohle behandelte Extrakt hat schwache Wirkung auf Citratmilieu, d. h. 5 ccm davon bewirken 12,4 % Zuwachs gegenüber den Aneurinkulturen. Für die Asparaginkulturen ist der entsprechende Mehrwert 78,3 %.

Die Beigabe einer optimalen Dosis B_1 zu 1 ccm des behandelten Extraktes hat als Folge, daß man dieselben Trockengewichte bekommt wie mit dem unbehandelten Extrakt, etwas weniger deutlich allerdings mit den Citratkulturen.

Auch hier trennen sich die Wachstumskurven bei der Menge von 1 ccm des zugegebenen Extraktes. Wir müssen deshalb darauf schließen, daß der durch den unbehandelten Extrakt bewirkte wachstumsfördernde Effekt auf andere Substanzen als auf das B_1 zurückzuführen ist.

2. Extrakte von Blättern höherer Pflanzen

In diesem Abschnitt haben wir uns die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, inwieweit der oder die in den vorher beschriebenen Extrakten sich vorfindenden Faktoren ebenfalls in Blättern von höheren Pflanzen, Sträuchern und Bäumen vorhanden sind.

Die Blätter wurden im Trockenschrank bei 100° getrocknet und pulverisiert. Dieses Blattpulver diente zur Herstellung von 5‰igen Extrakten, indem es mit destilliertem Wasser während 15 Minuten bei 115° autoclaviert wurde. Von diesen 5‰igen Extrakten wurde 1 ccm zu Citratmilieu gegeben. Zum Vergleich setzten wir eine Serie mit 5‰igem Weizenkeimextrakt und 5‰igem Hefe-Extrakt an.

Fig. 8 Entwicklung von *Mucor Ramannianus* in Gegenwart von steigenden Mengen von Bierwürze auf 2 verschiedenen Nährlösungen (siehe Tab. 29).

Abkürzungen = siehe Fig. 5 und 6.

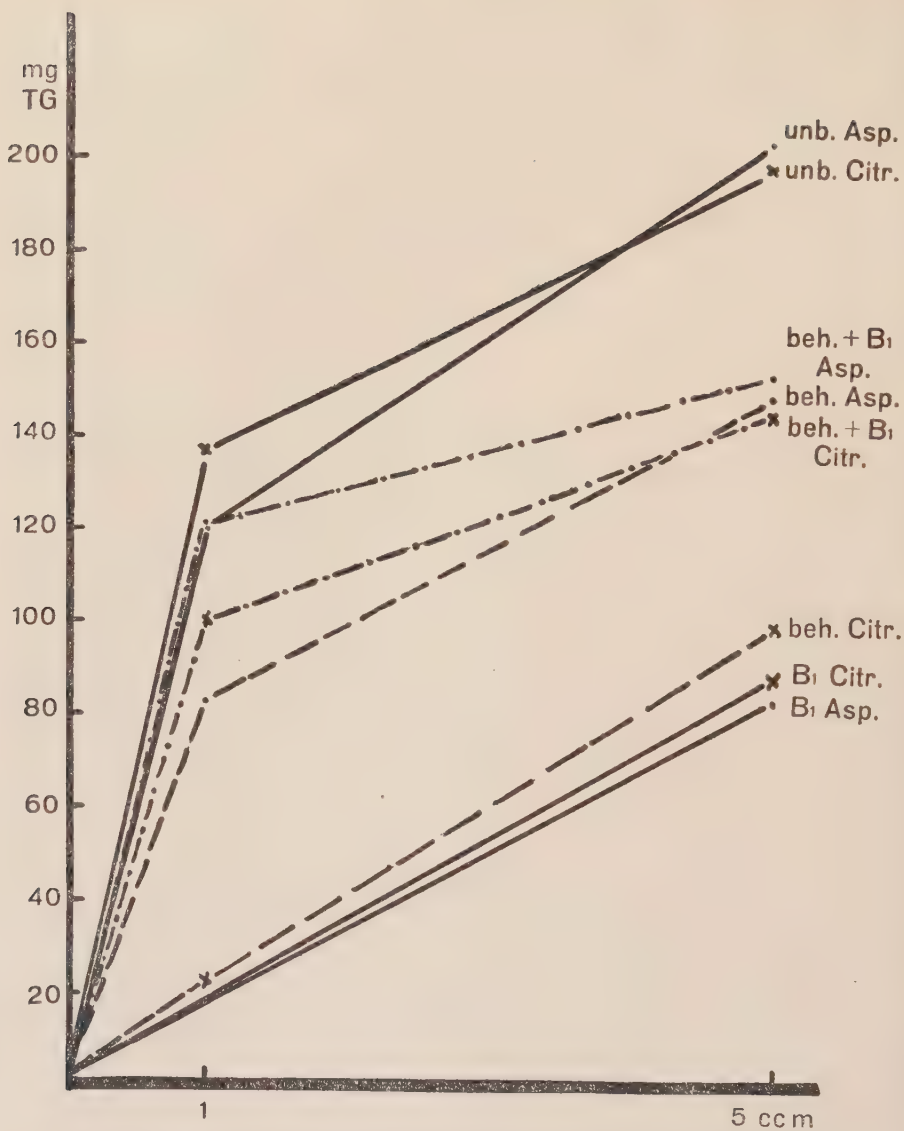


Fig.9 Entwicklung von *Mucor Ramannianus* in Gegenwart von steigenden Mengen von Hefe-Extrakt 5 % auf 2 verschiedenen Nährlösungen (siehe Tab.30).
Abkürzungen = siehe Fig.5 und 6.

Tabelle 31

Wirkung versch. Blattextrakte auf *M. angulisporus*. Mit Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte in Prozenten bezogen auf die Kontrollen. 1 ccm Extrakt pro Kultur.

1. Kontrollen	68,9 mg	
2. <i>Brassica rubra</i>	70,0 mg	(+1,5 %)
3. <i>Allium Ampeloprasum</i>	77,2 mg	(+12,0 %)
4. <i>Zea mais</i>	77,0 mg	(+11,7 %)
5. <i>Vitis vinifera</i> (gelbe Bl.).....	102,5 mg	(+48,7 %)
6. " " (grüne Bl.).....	78,5 mg	(+13,9 %)
7. <i>Spinacia oleracea</i>	76,1 mg	(+10,4 %)
8. <i>Cydonia vulgaris</i>	89,5 mg	(+29,8 %)
9. <i>Prunus Laurocerasus</i>	77,8 mg	(+12,9 %)
10. <i>Solanum Lycopersicum</i>	93,5 mg	(+35,7 %)
11. <i>Pinus leucodermis</i>	82,1 mg	(+19,1 %)
12. Weizenkeimextrakt 5 %	129,5 mg	(+88,5 %)
13. Hefe-Extrakt 5 %	157,0 mg	(+127,8 %)

Wie aus Tabelle 31 ersichtlich, fördern alle Extrakte das Wachstum von *M. angulisporus*, jedoch erreicht keiner die Werte von den Extrakten aus Hefe oder Weizenkeimen. Besonders geeignet scheinen Extrakte aus *Vitis* (gelbe Blätter) und *Solanum*; *Cydonia* erreicht auch noch Werte über 20 % Steigerung gegenüber den Kontrollen. Weniger günstig sind *Brassica*, *Allium*, *Zea mais*, *Vitis* (grüne Blätter), *Spinacia* und *Prunus*; *Pinus* bewirkt noch einen Mehrzuwachs von 19,1 %.

Ausgenommen in den Fällen 5, 8, 10 scheinen also die untersuchten Blattextrakte arm an wachstumsfördernden Faktoren für *M. angulisporus* zu sein.

Eine sehr bemerkenswerte Eigentümlichkeit läßt dieser Versuch jedoch erblicken. Wir hatten die *Vitis*-Blätter zu verschiedenen Zeitpunkten gepflückt: einmal Anfangs September, als die Blätter noch grün, und einmal einige Wochen später, als sie vergilbt waren. Der Extrakt aus den vergilbten Blättern ist nun aber um volle 30,5 % wirksamer als derjenige erhalten aus den grünen Blättern. Dies zeigt deutlich, daß man bei den Schlußfolgerungen der Resultate Vorsicht walten lassen muß. Es ist wohl anzunehmen, daß die Blätter, zu verschiedenen Jahreszeiten geprüft, auch verschiedene Resultate liefern könnten. Dieses Problem hängt mit demjenigen der Assimilation der höhern Pflanze zusammen und liegt außerhalb des gesteckten Rahmens und wurde weiter nicht verfolgt.

3. Wirkung des Harns als Wachstumsfaktor

Harn ist einer der Stoffe, die am schwersten zu untersuchen sind, denn als Exkret des menschlichen Organismus ist er ganz von dessen Stoffwechsel abhängig. Immerhin steht fest, daß der menschliche Harn aneurinhaltig ist. Es wird angenommen, daß während 24 Stunden 30 bis 100 γ B₁ im Harn ausgeschieden werden können (15). Schopfer für *Phycomyces Blakesleeanus* (13) und Müller für *Mucor Ramannianus* (19) haben für diese Organismen im Harn ebenfalls wirksame Faktoren gefunden.

Wenn wir unsererseits die Wirkung des Harns untersuchten, so war es mit dem vollen Bewußtsein der Komplexität des Harns. Die aus den unten angeführten Versuchen sich ergebenden Schlüsse beziehen sich infolgedessen nur streng auf den von uns verwendeten Harn.

Mengen von 0,5 ccm—5 ccm unverdünnten männlichen Harns, der morgens nach einem leichten Frühstück erhalten wurde, wurde den Citrat- und Asparaginkulturen von *R. Ramannianus* und *M. angulisporus* beigegeben.

Tabelle 32

Wirkung von Harn auf *M. Ramannianus* und *M. angulisporus*. Mit Asparagin 1⁰/₀₀ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. Zahlen in () bedeuten Mehr- oder Minderwerte in Prozenten, bezogen auf die Aneurinkulturen für *M. Ram.*, auf die Kontrollen für *M. angul.*

	Asparagin	NH ₄ -Citrat
<i>M. Ramannianus</i>		
Kontrollen	9,6 mg	1,1 mg
5 γ B ₁	88,0 mg	83,5 mg
0,5 ccm Harn	56,7 mg (—35,5)	23,5 mg (—71,8)
1 ccm »	48,4 mg (—45,0)	31,7 mg (—62,0)
2 ccm »	39,0 mg (—55,6)	37,4 mg (—55,2)
5 ccm »	30,1 mg (—65,8)	31,0 mg (—62,8)
<i>M. angulisporus</i>		
Kontrollen	66,1 mg	64,1 mg
0,5 ccm Harn	95,9 mg (+45,0)	70,5 mg (+9,9)
1 ccm »	99,3 mg (+50,2)	46,8 mg (—26,9)
2 ccm »	100,3 mg (+51,7)	52,1 mg (—18,7)
5* ccm »	51,6 mg (—21,9)	65,8 mg (+2,6)

Das Verhalten von *M. Ramannianus* ist auf beiden Milieus gleich: wohl vermag der Harn zum Wachsen zu bringen, jedoch werden die mit 5 γ B₁ erhaltenen Werte nicht erreicht. Die Prozente beziehen sich auf diesen Wert.

M. angulisporus reagiert anders. Auf Asparaginemilieu stehen die Kulturen mit 0,5 ccm, 1 ccm und 2 ccm Harn respektive 45 %, 50,2 % und 51,7 % über den Kontrollen; 5 ccm des unverdünnten Harns wirken inhibitorisch. Der gleiche Harn aber auf Citratmilieu wirkt nur mit 0,5 ccm schwach positiv, mit 1 ccm und 2 ccm negativ.

Einmal mehr kommt das verschiedenartige Verhalten von *M. Ramannianus* und seiner Varietät einerseits und der beiden verwendeten Nährmedien anderseits zum Ausdruck.

In unserem Harn existieren also Stoffe, die je nach Milieu auf das Wachstum von *M. angulisporus* fördernd wirken. Es wurden aber auch mit Harn die mit Bierwürze, Hefe-Extrakt und Weizenkeimextrakt erhaltenen Werte nicht erreicht. Der Versuch mit Harn ist jedoch insofern interessant, als er zeigt, daß die wachstumsfördernden Substanzen für *M. angulisporus* sowohl dem Pflanzen- als auch dem Tierreich entnommen werden können.

4. Wirkung von Extrakten von Mycelien und entsprechendem Milieu von *M. angulisporus* und *M. Ramannianus* auf andere Kulturen von *M. angulisporus*

Bis jetzt ist es uns nicht gelungen, den oder die wachstumsfördernden Faktoren von *M. angulisporus* zu identifizieren; wir wissen bloß, daß sie existieren. In diesem Schlußversuch war die folgende Tatsache begleitend: es ist beobachtet worden, daß Extrakte von Organismen, die für Aneurin autotroph sind, das Wachstum von Organismen, die für B₁ heterotroph sind, zu aktivieren vermögen, wenn letztere auf synthetischer vitaminfreier Nährlösung kultiviert werden (15). In unserem Versuch trachteten wir festzustellen, ob, umgekehrt, Extrakte der heterotrophen Art einerseits und der autotrophen Art anderseits, auf das Wachstum der autotrophen Art und auf die Entwicklung dieses Organismus einen Einfluß haben. Es wurde deshalb wie folgt vorgegangen:

Kulturen von *M. angulisporus* und *M. Ramannianus* wurden auf unserem Citratmilieu gezüchtet, und nach 3 verschiedenen Perioden geerntet. Die Kulturen von *M. angulisporus* wurden pro Periode einmal ohne jeglichen Vitaminzusatz und einmal mit 2 ccm eines 5 %igen Weizenkeimextraktes kultiviert. *M. Ramannianus* enthielt pro Periode 5 γ B₁ und ebenfalls 2 ccm Weizenkeimextrakt. Eine 1 %ige Lösung der Mycelien und die entsprechende Nährlösung wurden als mögliche Wuchsstoffquellen den Asparagin- und Citratkulturen von *M. angulisporus* beigegeben. Hier ist die Versuchsanordnung:

1. Kontrollen

2. 2 ccm Nährlösung von 8 Tage alten *M. angul.*-Kulturen,
ohne Weizenkeimextrakt

3. 2 ccm Nährlösung von 8 Tage alten *M. angul.*-Kulturen,
+ 2 ccm WKE

4. 2 ccm Nährlösung von 16 Tage alten *M. angul.*-Kulturen, ohne WKE
5. 2 ccm Nährlösung von 16 Tage alten *M. angul.*-Kulturen, + 2 ccm WKE
6. 2 ccm Nährlösung von 24 Tage alten *M. angul.*-Kulturen, ohne WKE
7. 2 ccm Nährlösung von 24 Tage alten *M. angul.*-Kulturen, + 2 ccm WKE
8. 2 ccm 1%iger Extrakt 8 Tage alter *M. angul.*-Mycelien, ohne WKE
9. 2 ccm 1%iger Extrakt 8 Tage alter *M. angul.*-Mycelien, + 2 ccm WKE
10. 2 ccm 1%iger Extrakt 16 Tage alter *M. angul.*-Mycelien, ohne WKE
11. 2 ccm 1%iger Extrakt 16 Tage alter *M. angul.*-Mycelien, + 2 ccm WKE
12. 2 ccm 1%iger Extrakt 24 Tage alter *M. angul.*-Mycelien, ohne WKE
13. 2 ccm 1%iger Extrakt 24 Tage alter *M. angul.*-Mycelien, + 2 ccm WKE
14. 2 ccm Nährlösung von 8 Tage alten *M. Ram.*-Kulturen, + 5 γ B₁
15. 2 ccm Nährlösung von 8 Tage alten *M. Ram.*-Kulturen, + 2 ccm WKE
16. 2 ccm Nährlösung von 16 Tage alten *M. Ram.*-Kulturen, + 5 γ B₁
17. 2 ccm Nährlösung von 16 Tage alten *M. Ram.*-Kulturen, + 2 ccm WKE
18. 2 ccm Nährlösung von 24 Tage alten *M. Ram.*-Kulturen, + 5 γ B₁
19. 2 ccm Nährlösung von 24 Tage alten *M. Ram.*-Kulturen, + 2 ccm WKE
20. 2 ccm 1%iger Extrakt 8 Tage alter *M. Ram.*-Mycelien, + 5 γ B₁
21. 2 ccm 1%iger Extrakt 8 Tage alter *M. Ram.*-Mycelien, + 2 ccm WKE
22. 2 ccm 1%iger Extrakt 16 Tage alter *M. Ram.*-Mycelien, + 5 γ B₁
23. 2 ccm 1%iger Extrakt 16 Tage alter *M. Ram.*-Mycelien, + 2 ccm WKE
24. 2 ccm 1%iger Extrakt 24 Tage alter *M. Ram.*-Mycelien, + 5 γ B₁
25. 2 ccm 1%iger Extrakt 24 Tage alter *M. Ram.*-Mycelien, + 2 ccm WKE

Tabelle 33

Wirkung von *M. Ram.*- und *M. angul.*-Mycelien u. Nährlösg. auf *M. angul.* Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 1/100 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen.

Numerierg. entsprechend Schema S. 49/50	Gewicht in mg		Zuwachs in ‰ bezogen auf d. Kontr.	
	Asparagin	NH ₄ -Citrat	Asparagin	NH ₄ -Citrat
1.	68,3	83,3	—	—
2.	74,0	85,7	8,3	2,2
3.	88,7	90,1	29,8	7,5
4.	87,1	94,7	27,5	13,0
5.	97,5	99,5	42,7	18,7
6.	95,1	90,5	39,2	7,9
7.	100,8	92,9	47,5	10,8
8.	90,2	87,7	32,0	4,6
9.	100,5	91,7	47,1	9,4
10.	100,7	92,2	47,4	10,0
11.	102,6	109,9	50,2	31,1
12.	101,0	104,2	47,8	24,3
13.	96,6	104,5	41,4	24,7
14.	81,8	99,6	19,7	18,8
15.	87,2	95,8	27,6	14,3
16.	90,4	94,4	32,3	12,6
17.	97,8	100,7	43,1	20,1
18.	94,1	94,4	36,3	12,6
19.	90,5	100,6	32,5	20,0
20.	106,4	119,8	55,7	42,9
21.	106,1	100,5	55,3	19,9
22.	105,7	105,8	54,7	26,3
23.	106,0	103,7	55,1	23,8
24.	111,2	104,9	62,8	25,1
25.	100,4	102,1	46,9	21,8

Was ist über diesen Versuch zu sagen? Betrachten wir die prozentualen Mehrwerte, bezogen auf die Kontrollen, so müssen wir feststellen, daß in den 24 Fällen nirgends eine Hemmung eintritt, sondern daß sich die ‰ zwischen 2,2 ‰ und 62,8 ‰ bewegen.

Mit *Asparagin* verhalten sich die untersuchten Extrakte wie folgt: Die stärksten Förderungen werden mit den Extrakten der Mycelien erreicht, wobei wenig Unterschied besteht zwischen den 3 Perioden und *M. angulisporus* und *M. Ramannianus*, obwohl letzterer etwas höhere Werte liefert. Nach einer Wachstumsperiode von 8 Tagen besitzen die

Mycelien also bereits einen wachstumsfördernden Effekt auf *M. angulisporus*, und zwar sind die Kontroll- und Weizenkeimkulturen von *M. angulisporus* und die B₁- und Weizenkeimkulturen von *M. Ramannianus* etwa im selben Maße aktiv. Das Verhalten der entsprechenden Milieus ist etwas verschieden. Nach 8 Tagen ist die Nährlösung, auf der Angulisporuskulturen als Kontrollen gewachsen sind, nur schwach positiv, die Nährlösung, die Weizenkeimextrakt enthält, begreiflicherweise stärker. Nach 16 Tagen hat sich die Wirkung der Kontroll-Nährlösung bereits verdreifacht, diejenige der Weizenkeim-Nährlösung nicht ganz verdoppelt. Nach 24 Tagen ist die Wirkung der Kontroll-Nährlösung noch gestiegen, während jene der Weizenkeim-Nährlösung gleich geblieben ist. Mit den Ramannianus-Nährlösungen ergibt sich ein ähnliches Bild. Wir müssen also die Tatsache registrieren, daß *M. angulisporus* Stoffwechselprodukte in die Nährlösung absondert, die auf eine andere Angulisporuskultur wachstumsfördernd wirkt, aber offenbar keinen Einfluß hat auf die diese Stoffe ausscheidende Kultur selbst.

Mit *Ammoniumcitrat* verhalten sich die Extrakte folgendermaßen: Ein großer Unterschied besteht im Verhalten von Extrakten aus *M. angulisporus*- und *M. Ramannianus*-Mycelien nach der ersten Periode (8, 20). Während die B₁-Kultur von *M. Ramannianus* (20) einen Mehrwert von 42,9 % erreicht, beträgt der Wert für die Kontroll-Kultur von *M. angulisporus* (8) nur 4,6 %. Die entsprechenden Werte mit Asparagin waren 32,0 % (8) und 55,7 % (20). Die Werte der Weizenkeimkulturen von *M. angulisporus* (9) sind auch viel tiefer mit Citrat als mit Asparagin. Dieses wiederholt sich mit den 2 nächsten Perioden, so daß man füglich behaupten kann, daß sich die wachstumsfördernde Wirkung der 1 %igen Mycelextrakte auf Citratmilieu weniger auswirkt. Das gleiche gilt für die untersuchten Milieus. Die Werte sind sehr viel tiefer auf Citratmilieu als auf Asparaginemilieu. Es scheint also festzustehen, daß Kontroll-Kulturen von *M. angulisporus* auf Citratmilieu stets höhere Trockengewichtswerte liefern als auf Asparaginemilieu. Bei Zusatz von Wachstumsfaktoren jedoch wird das Asparaginemilieu für jene viel günstiger.

VI. Zusammenfassung

Dieser I. Teil kann in folgende Punkte zusammengefaßt werden: Die Auxo-heterotrophie von *Mucor Ramannianus* für B₁ und Thiazol ist erneut festgestellt worden. Dagegen besitzt dieser Organismus die Fähigkeit nicht, das Thiazol aus seinen Vorstufen aufzubauen.

Die günstigsten Stickstoffquellen für *M. Ramannianus* scheinen Asparagin und Ammoniumcitrat zu sein, wobei die Wirkung des letzteren auf dessen Citration zurückgeführt werden muß. Im Laufe der Untersuchungen erwies sich ein großer Unterschied im Verhalten dieser beiden Nährmedien. Dagegen ist erwiesen, daß das Citration *M. Ramannianus* nicht als Kohlenstoffquelle dient.

Es liegt der Beweis vor für die Auxo-autotrophie von *Mucor Ram. angulisporus*, einer Varietät von *M. Ramannianus*. Diese Autotrophie scheint aber eher partiell zu sein, denn die auf wuchsstofffreier Nährlösung erhaltenen Trockengewichtswerte erreichen diejenigen von *M. Ramannianus* mit optimaler Dosis B₁ nie. Ein Zusatz von Weizenkeimextrakt, Hefe-Extrakt und Bierwürze vermag das Trockengewicht um mehrere 100 % zu erhöhen. Dieselben Extrakte geben auch mit *M. Ramannianus* eine dem Aneurin zusätzliche Steigerung. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß es sich womöglich um 2 Faktoren handelt, wobei der eine von der Kohle adsorbiert wird, der andere nicht.

Andere natürliche Extrakte, wie Blattextrakte, Extrakte aus *Ramannianus*- und *Angulisporus*kulturen, sowie deren Nährlösungen und Harn, waren viel weniger wirksam. Desgleichen ist es nicht gelungen unter den untersuchten Vitaminen und Aminosäuren einen spezifischen Wachstoffsstoff für *M. angulisporus* zu finden. Mit Ausnahme einiger Aminosäuren, wurden alle Substanzen einzeln untersucht. Es ist wohl möglich, daß erst eine Kombination verschiedener Stoffe zum erwarteten Erfolg führen kann.

In bezug auf die Symbiosefähigkeit von *M. angulisporus* ist gefunden worden, daß entgegen der Hauptart *M. Ramannianus*, die Varietät keine Symbiose mit *Rhodotorula rubra* eingeht, ihr Trockengewicht erleidet dabei sogar eine Verminderung. Jedoch wurde beobachtet, daß *Rhodotorula* sich schwach entwickelt, was auf die Pyrimidinsynthese von Seiten des *M. Angulisporus* zu schließen ist.

II. TEIL

DIE BIOSYNTHESE DES BIOTINS DURCH ZWEI FÜR DIESES VITAMIN AUTOTROPHE MIKROORGANISMEN: MUCOR RAMANNIANUS MÖLL. UND MUCOR RAM. MÖLL. VAR. ANGULISPORUS

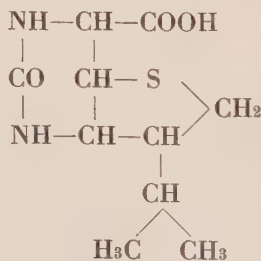
I. Einleitung

Es wird heute angenommen, daß viele Mikroorganismen auxo-autotroph für das Vitamin H sind. Namentlich ist bekannt, daß verschiedene Mucorineen große Produzenten von Biotin sind und daß die Nährlösung, auf der die Mikroorganismen gewachsen sind, einen stark fördernden Einfluß auf das Wachstum von *Saccharomyces cer.* aufweist. Mit einem für Biotin spezifischen Test ist es möglich, die von den Pilzen gebildete Menge zu messen. Schopfer (23,22) erkannte in *Phycomyces Blakesleeanus* und *Rhizopus suinus* solche Mikroorganismen und unterzog sie einer näheren Untersuchung. Es wurde festgestellt, daß das Biotin tatsächlich synthetisiert und in die Nährlösung abgeschieden wird.

Dasselbe kann nun für die Mucorinee *Mucor Ramannianus* und deren Varietät *M. Ram. angulispurus* gesagt werden. Deshalb wurde in den folgenden Kapiteln die Frage studiert, auf welche Art und Weise diese Mucorineen die Biosynthese des Biotins bewirken und welches der Einfluß diverser Wuchsstoffe und Aminosäuren auf diese Biosynthese sein kann.

II. Chemie des Biotins

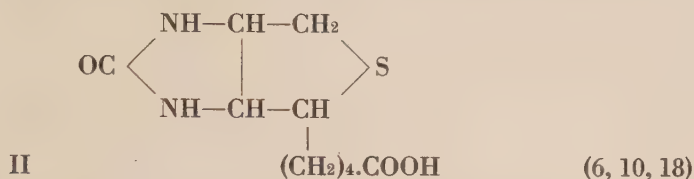
Kögl war es gelungen, aus Eigelb eine krystallisierende Verbindung zu isolieren (11, 12), welche, auch stark verdünnt, auf Hefekulturen wachstumsfördernd wirkte. Dieser sich als α -Biotin erweisenden Verbindung wurde die Formel (I)



I

zugeschrieben (13, 14, 15).

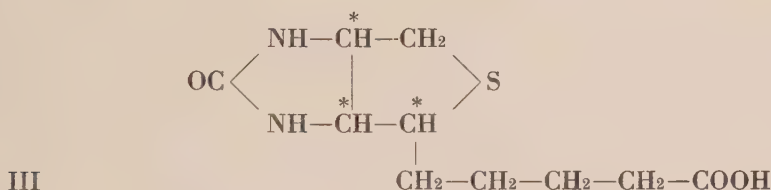
Ihrerseits isolierten du Vigneaud, P. György und Mitarbeiter aus Ochsenleber (27) und Milch (17) ein β -Biotin mit der Formel (II)



Diesem α - und β -Biotin kommt jedoch die gleiche Elementarzusammensetzung zu: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$. In biologischer Hinsicht verhalten sie sich ebenfalls gleich. Die Wirksamkeit des β -Biotins aber ist doppelt so groß wie die des α -Biotins (16).

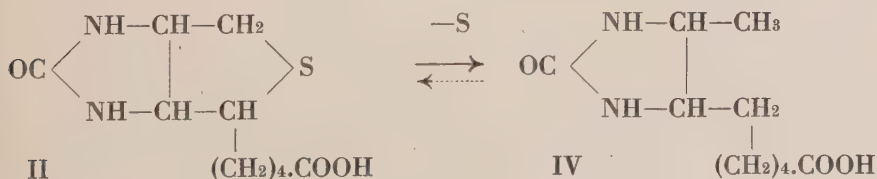
1945 gelang es Schnider, Bourquin und Grützner (3), das β -Biotin synthetisch herzustellen. Damit wurde es möglich, für wissenschaftliche Untersuchungen chemisch reines Vitamin H zu verwenden und so die Fehlerquellen auszuschalten, die sich oft mit aus natürlichem Material hergestellten Extrakten ergeben.

Von den 4 Racemverbindungen, die infolge der 3 asymmetrischen C-Atome möglich sind (4), fanden die Autoren 3 racemische Modifikationen des 2-(ω -carboxybutyl)-3, 4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophans (III)

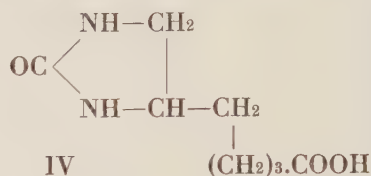
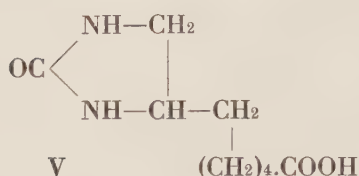


Es sind das d,l- β -Biotin und 2 isomere Verbindungen, das d,l- ψ -Biotin und d,l-iso- β -Biotin. Das d,l- β -Biotin erwies sich als mit dem aus Naturprodukt gewonnenen β -Biotin identisch und zeigt die erwartete Biotinwirkung im biologischen Test auf *Saccharomyces cerevisiae* und *Lactobacillus casei*. Die iso- und psi-Verbindungen dagegen sind biologisch unwirksam.

Durch Entschwefelung des natürlichen, optisch aktiven β -Biotins (II) erhielt du Vigneaud (30) ein optisch aktives Desthiobiotin (IV), das sich biologisch aktiv auf *Saccharomyces cer.* erwies (31).

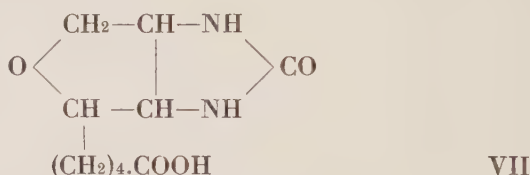


Dagegen sind die von du Vigneaud dargestellten 2 niedrigeren Homologen des d,l-Desthiobiotins und des d,l-nor-Desthiobiotins (das in der Seitenkette eine Methylengruppe weniger besitzt), nämlich das 5-(ω -carboxy-n-pentyl)-2-oxo-tetrahydro-imidazol (V) und das 5-(ω -carboxy-n-butyl)-2-oxo-tetrahydro-imidazol (VI), biologisch unwirksam (32).



Die Gruppe Bourquin, Schnider und Grüßner ihrerseits erhielt ein d,l,psi-Desthiobiotin und ein d,l-Desthiobiotin. Im Vergleich zu dem von du Vigneaud aus natürlichem β -Biotin erhaltenen Desthiobiotin, zeigte es sich, daß das d,l,psi-Desthiobiotin biologisch inaktiv, das d,l-Desthiobiotin aber aktiv war.

Es sind noch weitere Analogen des d,l- β Biotins gefunden worden. Namentlich wurde von Duschinsky und Mitarbeiter und von Hofmann (1, 7, 20) ein O-Hetero-Biotin oder Oxy-Biotin (VII) durch Substitution des Schwefels durch Sauerstoff erhalten.



Dieses Oxy-Biotin kann von verschiedenen Mikroorganismen, so von der Hefe (9), direkt als Wachstumsfaktor gebraucht werden.

III. Bestimmungsmethoden des Biotins

Nachdem wir einen kurzen Ueberblick über die chemische Beschaffenheit der Biotine gegeben haben, wenden wir uns nun deren Bestimmungsmethoden zu.

Der von uns gebrauchte Test für die Bestimmung des Vitamins H wurde von Snell, Eakin und Williams (24) vorgeschlagen. Einem Nährmilieu (siehe unten), welches die für *Saccharomyces cer.* notwendigen Salze, Wachstumsstoffe und Spurenelemente enthält, ausgenommen natürlich Biotin, werden steigende Mengen Biotin zugegeben. Die daraus resultierende Kurve (Standard-Kurve) kann mit andern Kurven, die aus unbe-

kannten Lösungen hervorgegangen sind, verglichen werden. Dieser sehr empfindliche Test erlaubt noch, Mengen von weniger als 0,001 γ mit genügender Genauigkeit festzustellen.

Für unsere Versuche sind wir folgendermaßen vorgegangen:

Von einer Agar-Schräggkultur von *Saccharomyces cer.* (Stamm R) werden Hefezellen in einem Erlenmeyerkolben überimpft, der ein seminaturliches Milieu mit folgender Zusammensetzung enthält:

Glucose	100 g
Ammoniumsulfat	0,6 g
Kaliumphosphat (monob.)	1,5 g
Natriumchlorid	0,5 g
Calciumchlorid	0,4 g
10/oige FeCl ₃ -Lösung	0,5 ccm
Bierwürze	30 ccm
Gewöhnliches Wasser	1 Liter

Diese, zur Vermehrung der Hefezellen bestimmte Kultur wird bei 29° C 3 Tage lang bebrütet. Dann wird die Hefe zentrifugiert, dreimal gewaschen und in destilliertem, sterilem Wasser suspendiert. Diese Suspension wird als Impflösung gebraucht. Es ist streng darauf zu achten, daß die Impflösung nicht aus alten Kulturen hergestellt wird. Wir haben die Beobachtung gemacht, daß über 25 Tage alte Agarkulturen eine Impflösung geben, die auf Biotin schlecht oder überhaupt nicht mehr reagiert und sich daher für den Test nicht mehr eignet. Die normale Impflösung selber kann im Kühlschrank nicht mehr als 10 Tage aufbewahrt werden.

Die von uns gebrauchte Nährlösung weist folgende Zusammensetzung auf:

Aqua dest.	1	Liter
Glucose	20	g
Asparagin	0,1	g
Ammoniumsulfat	3	g
Monobas. Kaliumphosphat	2	g
Magnesiumsulfat	0,25	g
Calciumchlorid	0,25	g
Borsäure H ₃ BO ₄	1	mg
Zinksulfat	1	mg
Manganchlorid	1	mg
Titanchlorid	1	mg
Eisen(III)chlorid	0,5	mg
Kupfersulfat	0,1	mg
Kaliumiodid	0,1	mg
Inositol	5	mg
β -Alanin	0,5	mg
Aneurin	20	γ
Adermin	20	γ
Pantothensäure	20	γ

25 ccm dieser Nährlösung werden in 150 ccm Erlenmeyerkolben (Jena) gegeben und während 15 Minuten bei 115° im Dampfautoclaven sterilisiert. Als Pfropfen wurde reinste Spitalwatte verwendet.

Für die Standard-Kurven wurden jeweils 3 Biotin-Lösungen verschiedener Konzentrationen gebraucht: 10mγ, 5mγ und 2,5mγ pro 1 ccm. Von diesen drei Lösungen wurden 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 und 2 ccm zugegeben. Dies führt zum Vorteil, daß an Hand dieser 3 Standard-Kurven jede einzelne in bezug auf die 2 andern geprüft und somit jede Unregelmäßigkeit oder Unstimmigkeit im Standard selber festgestellt werden kann. Denn es ist selbstverständlich, daß ein Vergleich mit einer unrichtigen Standard-Kurve zu falschen Resultaten führen muß.

Die zu analysierende, unbekannte Substanz wird ebenfalls in Mengen von 0,05 ccm—2 ccm beigegeben und ergibt schließlich auch eine Kurve.

Die Kolben der Standardlösung und jene der zu prüfenden Substanz werden mit 2 Tropfen der oben beschriebenen Impflösung beschickt und nach 2 Tagen bei einer Temperatur von 29° nephelometrisch gemessen.

Die Berechnung gibt sich folgendermaßen:

Auf Milimeterpapier werden auf der Ordinate die steigenden nephelometrischen Werte aufgetragen und die steigenden Mengen der bekannten Biotin- und der unbekannten Lösung auf der Abzisse.

Der Vergleich zwischen Standard-Kurve mit bekanntem Gehalt an Biotin und den andern Kurven ermöglicht die genaue Berechnung der unbekannten Menge Biotin. Drei Punkte auf dem aufsteigenden Teil der Kurve sind aber mindestens dazu notwendig. Je näher im übrigen die Kurven beieinander liegen, desto genauer werden die Resultate.

IV. Der Gehalt an Biotin des Thallus und der Nährlösung von *Mucor Ramannianus* Möll. und *M. Ram. Möll. var. angulisporus* in Funktion des B_i

1. Vorbereitung der Extrakte

Die Thalli werden durch Filtration von ihrer Nährlösung getrennt, gewaschen, bei 100° getrocknet und im Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Davon wird eine genau abgewogene Menge zu einem bestimmten Quantum destilliertem Wasser gegeben und während 15 Minuten bei 115° autoclaviert. Das Verhältnis 1 Teil Wasser zu 10 Teilen Trockensubstanz hat sich als günstigstes ausgewiesen. Erhöht man die Menge der Trockensubstanz, so wird nicht mehr alles Biotin gelöst und umgekehrt, bei größerer Wasserzugabe, wird die Konzentration der erhaltenen Lösung meist zu gering.

Ferner wurde auch geprüft, ob bei einem einmaligen Autoclavieren von 15 Minuten bei 115° alles Biotin gelöst wird, oder ob eventuell bei

längerem oder zweimaligem Autoclavieren «gebundenes» Biotin sich freisetzen ließe.

Wie unsere Versuche zeigten, genügt 1 Autoclavieren von 15 Minuten bei 115°, um alles freie Biotin zu extrahieren. Extrakte, nach viermaligem Autoclavieren von 15 Minuten und nach einmaligem von 1 Stunde bei 115° erzielten im *Saccharomyces*-Test keinen Effekt.

2. Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Biosynthese des Biotins

a) Asparagin

Um einen gerechten Eindruck über die Biosynthese des Biotins zu bekommen ist es nötig, nicht nur die Menge Biotin pro g Trockengewicht zu berechnen, sondern wir müssen die absolute Menge Biotin auf das Gewicht der Thalli zurückführen. Diese Menge, mit dem in die entsprechende Nährlösung diffundierenden Biotin addiert, gibt die Totalproduktion von Biotin. Schopfer (22) hat mit *Phycomyces Blakesleeana*s klar demonstriert, daß mehr als 80 % des gebildeten Biotins in die Nährlösung diffundiert, wobei der Thallus natürlicherweise Sitz der Synthese ist. Diese Ergebnisse konnten mit *Mucor Ramannianus* und *M. Ram. angulisporus* bestätigt werden, wie die folgende Tabelle 34 zeigt. Daher werden im Laufe unserer Versuche meist folgende Größen bestimmt:

1. $\mu\gamma$ Biotin pro Gramm Trockengewicht
2. $\mu\gamma$ Biotin pro 25 ccm Nährlösung
3. $\mu\gamma$ Biotin pro Thallus
4. $\mu\gamma$ Biotin pro Thallus + Nährlösung (Totalbiotin)
5. $\mu\gamma$ Totalbiotin pro 1 mg Trockengewicht

Tabelle 34

Mit 1 % Asparagin. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Die Zahlen in () beziehen sich auf die oben angegebene Aufstellung. K = Kontrollen

Bt in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
K	9	146	337,25	1,31	338,56	37,61
0,01	26	228	446,25	5,93	452,18	17,38
0,02	46,8	234	490,06	10,95	501,01	10,70
0,05	61,6	242	746,25	14,90	761,15	12,35
0,1	100,0	206	1290,07	20,60	1310,67	13,10
0,25	126,5	198	1385,50	25,44	1410,94	10,98
0,5	146,2	216	1411,75	31,58	1443,33	9,87
1	145,1	194	1493,00	28,13	1521,13	10,49
2,5	150,2	346	1666,66	51,97	1718,63	11,44
5	134,6	—	3048,75	—	—	—
10	138,5	164	3048,75	22,71	3076,46	22,21

Die Tabelle zeigt, daß der relative Biotingehalt pro Gramm Trockengewicht der Thalli parallel zunimmt mit steigenden Mengen Aneurin, d. h. mit dem Grade der Entwicklung. Das Maximum ist erreicht bei $2,5 \gamma B_1$, was der optimalen Dosis für *M. Ramannianus* entspricht. Bei einer supraoptimalen Dosis von 10γ Aneurin geht der Biotingehalt auf die Hälfte zurück. Das gleiche gilt für die Menge Biotin, die pro Thallus berechnet wurde. Für das in die Nährlösung diffundierte Biotin tritt insofern eine Aenderung auf, als das Maximum bei supraoptimalen Dosen erreicht wird. Diese Tatsache beeinflußt den Totalbiotingehalt, Milieu plus Thallus M + T, indem hier das Maximum bei 5γ und 10γ liegt.

Sehr aufschlußreich ist das Verhältnis zwischen Trockengewicht der Thalli und deren synthetisierte Totalmenge Biotin. Bei der Betrachtung der Ziffer (5) fällt sofort auf, daß die Gesamtmenge Biotin, produziert von 1 mg Trockensubstanz der Kontrollen größer ist als diejenige bei den Dosen von $2,5 \gamma$ und 10γ , die dem Höchstgewicht einerseits und der größten Totalbiotinmenge andererseits entsprechen. In Prozenten ausgedrückt macht dies im ersten Fall 227 % und im zweiten Fall 69 % aus.

Es könnte natürlich möglich sein, daß die für *Mucor* gebrauchte Nährlösung an sich schon einen Einfluß auf *Saccharomyces* ausübte. Daher wurde stets eine Blindserie den andern Serien beigelegt. Sie enthält kein B_1 und wurde nicht geimpft. Ihre Untersuchung erfolgte aber gleichzeitig mit den andern Nährmedien. Es hätte ja sein können, daß sich Stoffe in der Nährlösung befänden oder daß sich im Laufe der Versuchsdauer Stoffe gebildet hätten, die auf *Saccharomyces* wirkten. Es stellte sich aber heraus, daß diese Blindlösungen keinerlei Einfluß auf *Saccharomyces* ausüben.

Schon eine minimale Zugabe von $0,01 \gamma$ Aneurin läßt den Biotingehalt auf die Hälfte zurücksinken, der sich zwischen $0,02 \gamma$ und $2,5 \gamma$ stabilisiert. Bei 10γ erfolgt erneut ein Anstieg. Man bekommt den Eindruck, als ob das für die Entwicklung von *M. Ramannianus* unbedingt notwendige Aneurin auf die Biosynthese des Biotins hemmend wirke. Erst bei supraoptimalen Mengen B_1 scheint dieser inhibitorische Effekt wieder zu verschwinden.

b) Ammoniumcitrat

Die im I. Teil vorgelegten Ergebnisse, daß sowohl *Mucor Ramannianus* wie auch *M. Ram. angulisporus* mit Ammoniumcitrat höhere Trockengewichte ergeben als mit Asparagin, veranlaßten uns, diese Tatsache auch in bezug auf die Biosynthese des Biotins zu untersuchen.

Die Resultate veranschaulichen Tabelle 35 und 36. Für *M. Ramannianus* entsprechen auch hier die höchsten Trockengewichtswerte, sowohl den höchsten Total-Biotinmengen als auch der größten Menge Biotin pro Thallus und pro Gramm Trockengewicht. Nur liegen sie tiefer als mit Asparagin. Diese Entwicklung war zu erwarten und wurde schon von Schopfer (23) für *Phycomyces Blakesleeana* registriert. Viel aufschluß-

reicher ist wiederum das Verhältniss zwischen totalem Biotin pro Milligramm entsprechendem Trockengewicht des Mycels.

Obschon hier ebenfalls die niederen Trockengewichte relativ mehr Biotin produzieren, sind die Werte für die Trockenhöchstgewichte um die Hälfte und, wenn wir die supraoptimale Dosis von 10 γ nehmen, sogar dreimal tiefer als mit Asparagin. Mit andern Worten, die Stickstoffquelle in Form von Ammoniumcitrat scheint für die Biosynthese des Biotins weniger günstig zu sein.

Tabelle 35

Mit Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. K = Kontrollen. Zahlen in () siehe Schema S. 59.

Bt in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
K	Spuren	—	14,83	—	—	—
0,5	67	47	699,50	3,15	702,65	10,48
1	117,8	57	1059,22	6,71	1065,93	9,05
5	184,6	72	1169,30	13,29	1182,59	6,40
10	139,1	82	952,65	11,40	964,05	6,93

Im Gegensatz dazu stehen die Verhältnisse, wie wir sie bei *M. Ram. angulisporus* antreffen. Die pro 1 mg Trockengewicht erhaltene Totalbiotinmengen variieren zwischen 9,35 und 12,63 m γ und sind den Resultaten für *M. Ramannianus* auf Asparaginmilieu vergleichbar.

Verständlicherweise sind die Mengen des Totalbiotins kleiner als mit *M. Ramannianus*, überschreiten doch die Trockengewichte 50 mg nicht. Aber wir können immerhin die Vermutung aufstellen, daß der partiell auxo-autotrophe *M. Ram. angulisporus* in bezug auf die Biosynthese des Biotins wirksamer ist. Auffallend ist ferner der im Vergleich zu *M. Ramannianus* sehr starke Gehalt an Biotin der Mycelien pro Gramm Trockengewicht.

Tabelle 36

Mucor Ramannianus angulisporus mit Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. K = Kontrollen. Zahlen in () siehe Schema S. 59.

Bt in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
K	49,8	496	553,34	24,68	578,03	11,60
0,01	48,2	554	450,85	26,71	477,56	9,90
0,5	49,4	575	434,65	28,43	463,08	9,35
5	49,1	548	593,35	26,91	620,26	12,63

c) Glykokoll

Als weitere Stickstoffquelle ist noch Glykokoll einer eingehenden Untersuchung unterzogen worden. Wie die *Tabelle 37* veranschaulicht, liegen die Verhältnisse so, daß 1 mg Trockensubstanz etwas höhere Werte liefert als mit Asparagin.

Tabelle 37

Mucor Ramannianus mit Glykokoll 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte aus 12 Kulturen. K = Kontrollen. Zahlen in () siehe Schema S. 59.

B ₁ in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
K	2,0	76	67,62	1,52	69,14	34,57
0,01	14,8	600	250,65	8,88	259,53	17,53
0,05	46,2	400	562,45	18,48	580,93	12,57
0,1	58,7	326	930,10	19,14	949,24	16,17
0,5	91,5	363	1555,05	33,21	1588,26	17,35
1	92,4	208	798,05	19,19	817,24	8,84
5	92,1	123	1079,60	11,33	1090,93	11,84
10	79,0	123	895,65	9,72	905,37	11,46

Die sehr starke Produktion der Kontrollen ist auch hier wieder deutlich. Ob Glykokoll eine für die Biosynthese des Vitamins H günstigere Stickstoffquelle darstellt als Asparagin, kann hier nicht entschieden werden. Während mit Glykokoll mit 0,5 γ B₁ das Biotinoptimum erreicht wird, bekommen wir mit der gleichen Menge B₁ mit Asparagin fast gleichviel Biotin, müssen aber die Dosen Aneurin auf 5 γ oder 10 γ erhöhen, um zu der maximalen Biotinproduktion zu gelangen.

Die *Tabelle 38* zeigt die Biotinproduktion in Funktion der Konzentration des Glykokolls. Es wurden Konzentrationen von 0,5 ‰ bis 100 ‰ verwendet. Jeder Kultur wurde 2,5 γ Aneurin zugefügt. Das pro 1 mg Trockensubstanz synthetisierte Totalbiotin scheint 2 Maxima zu besitzen: eines mit 7 ‰ und eines mit 100 ‰. Diese supraoptimale Konzentration von Glykokoll hemmt die Entwicklung des Pilzes, fördert aber dessen Biotinproduktion.

Tabelle 38

Mucor Ramannianus mit variablen Glykokoll-Konzentrationen. Alter der Kulturen 30 Tage.
Temp. 19°. Durchschnittswerte von 6 Kulturen. Zahlen in () siehe Schema S. 59.

‰ Glykokoll	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
0,5	47,1	85	834,35	4,00	838,35	17,79
1	58,6	113	732,75	6,62	739,37	12,61
2	63,3	146	815,75	9,24	824,99	13,03
5	61,2	155	738,10	9,49	747,59	12,21
7	66,9	206	1735,05	13,78	1748,83	26,14
10	71,5	200	1542,70	14,30	1557,00	21,77
20	68,0	413	1398,35	28,08	1426,43	20,94
50	56,8	280	790,40	15,90	806,30	14,19
100	20,6	216	545,10	4,45	549,55	26,67

V. Der Gehalt an Biotin des Thallus und der Nährlösung von *Mucor Ramannianus* Möll. und *M. Ram. Möll. var.* *angulisporus* in Funktion der Zeit

Ein richtiges Bild über den Dynamismus der Biosynthese geben erst Versuche, die in Abhängigkeit der Zeit unternommen werden. Wir sind dabei wie folgt vorgegangen:

Mycel und die entsprechende Nährlösung werden nach Perioden von 5, 9, 15, 20, 26, 32 und 36 Tagen auf ihren Biotingehalt geprüft. Das Milieu enthält 1 ‰ Asparagin und 2,5 γ Aneurin pro Kultur. Die Resultate sind in Tabelle 39 und Fig. 10 aufgezeichnet.

Tabelle 39

Mucor Ramannianus. Untersuchung seines Biotingehaltes in Funktion der Zeit, mit 1 ‰ Asparagin. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe Seite 59.
2,5 γ B_i pro Kultur.

Perioden	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
5 Tage	7,90	1323	35,05	10,45	45,50	5,76
9 »	12,50	381	121,25	4,77	126,02	10,08
15 »	48,80	851	251,10	41,53	292,63	5,99
20 »	77,80	243	357,60	18,91	376,51	4,83
26 »	117,10	283	875,55	33,11	908,66	7,76
32 »	152,30	205	2054,60	31,22	2082,82	13,66
36 »	186,70	303	1779,60	56,57	1836,17	9,94

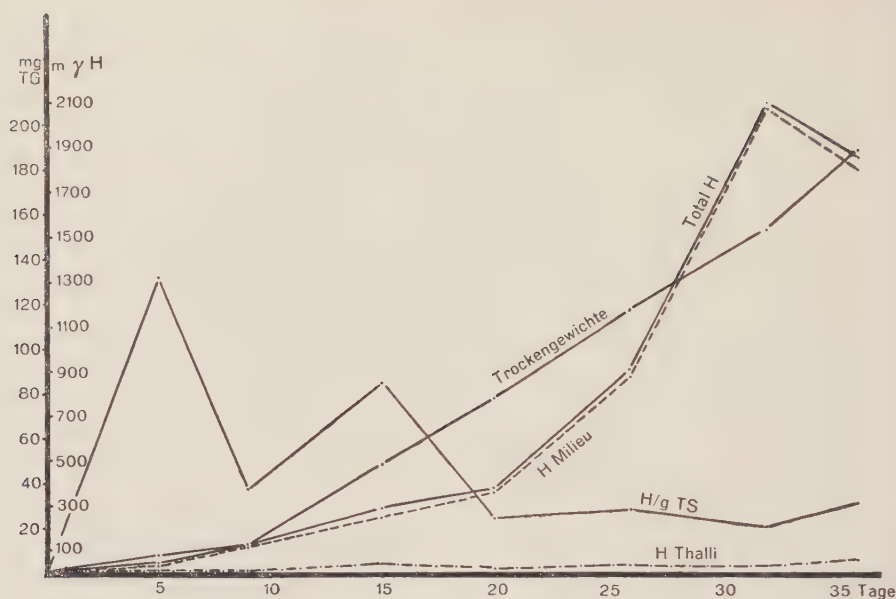


Fig. 10 Entwicklung von *Mucor Ramannianus* in Funktion der Zeit mit entsprechender Biosynthese des Biotins (siehe Tab. 39).

mg TG = Trockengewichte der Mycelien in Milligramm

$m_{\gamma} H$ = Menge Biotin in Milligramm

H/g TS = m_{γ} Biotin pro Gramm Trockensubstanz

H Milieu = m_{γ} Biotin pro 25 ccm Nährlösung

H Thalli = m_{γ} Biotin pro Thallus

H Total = m_{γ} Biotin pro 25 ccm Nährlösung + entsprechender Thallus.

Dieser Versuch läßt folgende Punkte erblicken:

1. Die relative Menge Biotin pro Gramm Trockengewicht ist der Entwicklung entgegengesetzt. Die höchste Zahl ist erreicht bei 5 Tagen Wachstum, wobei die Mycelien mit unsern Versuchsbedingungen auf flüssigen Nährmedien erst als weiße Flöckchen sichtbar werden. Dagegen fällt das Gewichtmaximum mit den niedrigen Werten zusammen. Diese Entwicklung von *Mucor Ramannianus* weicht erheblich von derjenigen von *Phycomyces Blakesleanus* ab. Schopfer (22) stellte für diese Mucorinee fest, daß der relative Gehalt Biotin pro Gramm Trockensubstanz dem Alter der Kultur parallel läuft. Die Höchstwerte von Biotin werden mit den Höchstgewichten erzielt. Es ist nicht zu vergessen, daß die beiden Pilzarten Unterschiede in bezug auf ihre Wachstumsschnelligkeit aufweisen. *Phycomycès* erreicht sein Maximum nach 7 Tagen, während es *M. Ramannianus* erst nach 30 Tagen tut. Es ist nicht ausgeschlossen, daß eben diese Differenz den Unterschied in der Biosynthese des Biotins bewirkt.

Es sieht fast so aus, als ob die Menge Biotin pro Gramm Trockengewicht unabhängig von der Entwicklung, abhängig aber eher von einer gewissen «Zeit» sei. Zumindest auffallend ist, daß sowohl in den Versuchen von Schopfer mit *Phycomyces*, als auch in den unsrigen mit *Mucor*, der höchste relative Gehalt an Biotin pro Gramm Trockensubstanz nach einer Wachstumsperiode von 5 bis 10 Tagen eintritt.

2. Die fast totale vom Thallus synthetisierte Menge Biotin diffundiert in die Nährlösung. Diese Anhäufung geht ziemlich parallel zu der Entwicklung des Pilzes, d. h. seiner Gewichtszunahme.

3. Betrachtet man die Menge Biotin, die durch 1 mg Trockensubstanz synthetisiert wird, so erkennt man, daß das Verhältnis am 32. Tag am günstigsten liegt. Dieser Periode entspricht auch die maximale Produktion an Biotin.

Zieht man zum Vergleich die Verhältnisse heran, wie sie sich für den autotrophen *M. Ram. angulispurus* vorfinden, so fällt auf, daß 1 mg der Trockensubstanz durchwegs mehr Biotin liefert als 1 mg der heterotrophen Art. Wie wir noch später sehen werden, ist das eine, für *M. Ram. angulispurus* typische Eigenschaft. Charakteristisch ist ferner der relativ schnell erreichte Biotintotalgehalt bei *M. Ram. angulispurus*: nach 10 Tagen schon 458 mγ, nach 9 Tagen für *M. Ramannianus* erst 126 mγ.

Die 3. Kolonne in *Tabelle 40* gibt die Menge Biotin in mγ pro Gramm Trockengewicht an. Es scheint sich für *M. Ram. angulispurus* dasselbe zu wiederholen wie für *M. Ramannianus*, nämlich die Errichtung eines zweiten Maximums nach einer Periode von 15 Tagen. Eine solche mit 2 Maxima behaftete Kurve, die für *M. Ramannianus* allerdings ausgeprägter ist, finden wir für *Phycomyces* wieder (Schopfer, 22).

Was die synthetisierte Menge des Vitamins anbetrifft, so häuft sich auch bei *M. Ram. angulispurus* das Biotin im Milieu an.

Tabelle 40

Mucor Ram. angulispurus, Untersuchung seines Biotingehaltes in Funktion der Zeit, mit 1 ‰ Asparagin und 2,5 γ Bi pro Kultur. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59. K = Kontrollen.

Perioden	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
6 Tage	7,1	—	174,17	—	(174,17)	(24,5)
10 »	18,4	400	451,25	7,36	458,61	24,92
15 »	21,3	486	874,95	11,81	886,76	36,49
20 »	32,9	364	603,25	11,98	615,23	19,00
25 »	36,6	339	1080,40	12,41	1092,81	29,80
30 »	42,9	334	1580,25	14,33	1594,58	37,17
30 Tg. K	45,6	27	1476,15	1,23	1477,38	32,40

VI. Einfluß von Wuchsstoffen und Aminosäuren auf die Biosynthese des Biotins durch *Mucor Ramannianus* Möll. var. *angulisporus*

Im Laufe der Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Wuchsstoffe und Aminosäuren auf das Wachstum von *M. Ram. angulisporus* wurde zugleich auch deren Effekt auf die Biosynthese des Biotins erforscht. Wir haben dieses Kapitel in 2 Abschnitte unterteilt: die eigentlichen Wuchsstoffe und Vitamine einerseits, die verschiedenen Aminosäuren anderseits.

A. WUCHSSTOFFE

1. Pyrimidin

Wie wir gesehen haben ist *M. Ram. angulisporus* für Aneurin autotroph, und sein Wachstum wird in keinem Fall von diesem Vitamin beeinflusst. Uns interessierte es, zu wissen, ob neben einer eventuellen Steigerung des Wachstums auch mit den beiden Komponenten des Aneurins sich eine Abweichung der Biosynthese feststellen ließe (siehe auch I. Teil, Seite 23). Die Resultate sind in *Tabelle 41* und *42* angegeben.

Tabelle 41

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 28 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

	Pyrimidin in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	71,8	106	234,15	7,60	241,75	3,36
	0,1	67,8	106	201,65	7,17	208,82	3,08
	20	62,1	72	228,80	4,45	233,25	3,75
Aspar. ..	Kontr.	51,8	106	346,45	5,48	351,93	6,79
	0,1	48,8	106	307,55	5,16	312,71	6,40
	20	55,4	92	402,45	5,10	407,55	7,35

Wir können sagen, daß Pyrimidin keinen großen Einfluß auf die Biosynthese des Biotins hat. Höchstens wirken 0,1 γ leicht hemmend und 20 γ leicht fördernd, wenn man das pro mg Thallus gebildete Total-Biotin berücksichtigt. Die Werte mit Asparagin sind rund doppelt so hoch.

2. Thiazol

Die gleichen Bemerkungen wie für Pyrimidin gelten auch für Thiazol.

Tabelle 42

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

	Thiazol in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	70,9	293	1581,30	20,74	1602,04	22,59
	0,1	61,1	409	1352,05	24,96	1377,01	22,53
	1	59,7	407	1378,10	24,30	1402,40	23,50
	10	62,1	358	1549,50	22,25	1571,75	25,31
	20	66,8	349	1234,70	23,28	1257,98	18,83
	Kontr.	59,8	413	3748,45	24,68	3773,13	63,10
Aspar. ..	0,1	52,8	432	1957,00	22,82	1979,82	37,50
	1	60,7	322	2359,35	19,51	2378,86	39,20
	10	58,5	380	2344,45	22,23	2366,68	40,45
	20	68,1	273	3027,30	18,56	3045,86	44,72
	Kontr.	59,8	413	3748,45	24,68	3773,13	63,10

Ein Milligramm Trockensubstanz produziert sogar auf Asparaginmilieu 3mal mehr Biotin als auf Citratmilieu, was wiederum ein Beweis dafür wäre, daß diese Stickstoffquelle für die Biosynthese am günstigsten ist. Wir werden später noch darauf zurückkommen.

3. Inositol

Für *Rhizopus suinus* hat Schopfer (23) festgestellt, daß Inositol allein auf die Biosynthese des Biotins keinen definierbaren Effekt erzielt, wohl aber wenn ihm noch Aneurin beigegeben wird.

Für *M. Ram. angulispurus* fanden wir, daß auf Ammoniumcitrat-Milieu Zugaben von 0,1 γ und 20 γ Inositol Biotinwerte geben, die tiefer liegen als die Kontrollen. Mit Asparagin dagegen erhalten wir eine Zunahme der pro mg Trockensubstanz gebildeten Totalbiotinmenge von 32,6 ‰ und 13,6 ‰ gegenüber den Kontrollen mit respektive 0,1 γ und 20 γ Inositol (siehe Tab. 43).

Tabelle 43

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 28 Tage, Temp. 19°
Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

	Inositol in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	50,0	70	226,70	3,51	230,21	4,60
	0,1	49,8	64	176,30	3,19	179,49	3,60
	20	53,3	69	219,85	3,67	223,52	4,19
Aspar...	Kontr.	35,8	93	269,55	3,34	272,89	7,62
	0,1	30,9	79	309,95	2,45	312,40	10,11
	20	32,9	37	283,70	1,21	284,91	8,66

4. Pantothensäure

Die aus β-Alanin und einem Buttersäurederivat zusammengesetzte Pantothensäure ist als Antigräuhaarvitamin bekannt (siehe auch I. Teil, Seite 27), ist aber auch für einige Hefearten unentbehrlicher Wachstumsfaktor. Inwieweit die Pantothensäure in den Prozeß der Biosynthese eingreift, möge an Hand folgender Tabelle illustriert werden.

Tabelle 44

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 28 Tage. Temp. 19°.
Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe Seite 59.

	Pantoth.s. in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	72,0	58	383,90	4,16	388,06	5,37
	0,1	78,8	79	521,40	6,20	527,60	6,69
	20	79,7	52	284,70	4,10	288,80	3,62
Aspar...	Kontr.	37,5	35	171,40	1,41	172,81	3,00
	0,1	38,1	44	210,15	1,66	211,81	5,55
	20	38,1	24	150,25	0,92	151,17	3,96

Wie ersichtlich, haben kleine Mengen einen fördernden Einfluß auf die Biosynthese, sowohl mit Asparagin, als auch mit Ammoniumcitrat. Relativ große Mengen, 20 γ, scheinen auf Citratmilieu inhibitorische Wirkung zu besitzen, auf Asparaginmilieu schwach fördernde. In Prozenten ausgedrückt ergibt sich für die Förderung auf Asparaginmilieu 85 ‰ und 32 ‰, auf Citratmilieu 24,5 ‰ und für die Hemmung 13,9 ‰. Die Prozente beziehen sich auf die Werte Totalbiotin von 1 mg Trockengewicht.

5. Nikotinsäure

Die Nikotinsäure (siehe I. Teil, Seite 26), heute als Antipellagravitamin bekannt, übt einen geringen Einfluß auf die Biosynthese des Biotins aus. Nach unsern Versuchen wirken auf Citratmilieu starke und schwächere Dosen hemmend. Das Asparaginemilieu ist günstiger insofern, als sowohl mit kleinen als auch mit großen Mengen eine Steigerung der Biosynthese bewirkt wird.

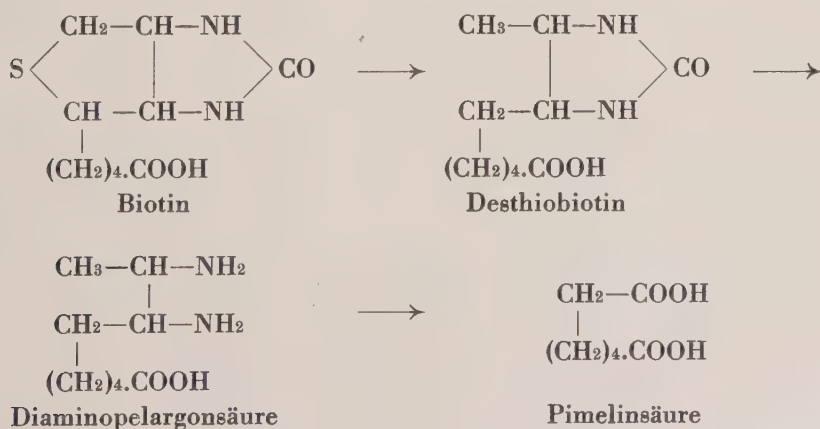
Tabelle 45

Mit Asparagin 1⁰/₀₀ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 28 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

	Nikotin- säure in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	72,0	58	383,90	4,16	388,06	5,37
	0,1	66,6	48	239,25	3,16	242,41	3,63
	20	82,2	65	229,40	5,33	234,73	2,85
Aspar...	Kontr.	37,5	35	171,40	1,41	172,81	3,00
	0,1	38,8	41	163,00	1,59	164,59	4,24
	20	39,8	49	155,20	1,96	157,16	3,94

6. Pimelinsäure

Heute kann man mit ziemlicher Sicherheit behaupten, daß die Pimelinsäure Vorstufe und Ausgangsprodukt der Biosynthese des Biotins ist. Die Abbauprodukte des Biotins sollen nach amerikanischen Autoren (30, 9) die folgenden sein:



In einer Arbeit über den Wuchsstoffbedarf des Diphtheriebacillus kommt Mueller (19) zum Schluß, daß Pimelinsäure auf das Wachstum jenes Organismus stimulierend wirkt. In Abwesenheit dieser Säure funktioniert das Biotin als zusätzlicher Wachstumsfaktor, was zu der Annahme verleitet, der Diphtheriebacillus benötige die Pimelinsäure zum Aufbau des Biotins. Die Arbeiten von R. E. Eakin & E. A. Eakin (2) werden am Schluß dieses Kapitels besprochen.

Es ist festgestellt worden, daß die Pimelinsäure das Biotin im *Saccharomyces*-Test nicht ersetzen kann (29), folglich besitzt die Hefe die Möglichkeit nicht, das Biotin aus dieser Vorstufe zu synthetisieren. Auch ist versucht worden, die Mikroorganismen auf Grund ihres verschiedenartigen Verhaltens in der Biosynthese des Biotins zu klassifizieren (25).

Die Diaminopelargonsäure dagegen besitzt 10 % Wirksamkeit des Biotins auf *Saccharomyces cer.* (28).

Wir wissen ferner, daß gewisse Mikroorganismen, autotroph für Biotin, dieses in großer Menge produzieren, wo es sich im Milieu ansammelt. Dies trifft zum Beispiel bei *Aspergillus* (2), *Phycomyces* (22) und *Rhizopus* (23) zu und, wie wir gesehen haben, bei *Mucor Ramannianus* und *M. Ram. angulispurus*. Es wurde nun die Aufgabe unternommen, zu untersuchen, ob die Pimelinsäure auf die Biosynthese des Biotins bei *M. Ram. angulispurus* einen fördernden Effekt erzielt oder nicht. Im bejahenden Fall hätten wir die Gewißheit, daß *M. Ram. angulispurus* die Fähigkeit besitzt, das Vitamin H aus seiner Vorstufe aufzubauen.

In einem Vorversuch konnten wir die Tatsache bestätigen, daß die Pimelinsäure der Hefe gegenüber unwirksam sei (29). Keine der von uns gebrauchten Verdünnungen waren auf *Saccharomyces* aktiv, so daß eine Steigerung der Biosynthese des Biotins nicht einem wachstumsfördernden Einfluß dieser Säure auf die Hefe zuzuschreiben ist.

Die Pimelinsäure wurde in Konzentrationen von 20 γ , 100 γ und 2000 γ den für *M. Ram. angulispurus* benötigten Nährlösungen, die nur durch ihre Stickstoffquelle differieren, beigelegt (Tab. 46). Es ergab sich, daß 20 γ Pimelinsäure auf beiden Nährmedien die Biosynthese des Biotins gewaltig steigern. Für die pro mg Trockensubstanz synthetisierte Menge Totalbiotin ergibt sich gegenüber den Kontrollen eine Steigerung von 648,6 % mit Asparagin und 576,8 % mit Ammoniumcitrat. Mit 100 γ Pimelinsäure folgt eine Zunahme von respektive 555,5 % und 564,5 %. Der Wert für Citratmilieu nähert sich also demjenigen für Asparagin mit 20 γ . Mit 2000 γ Pimelinsäure erhalten wir immerhin noch eine Steigerung von 451,9 % und 440,4, %. Aus diesem Versuch geht deutlich hervor, daß die Pimelinsäure die Biosynthese des Biotins direkt beeinflußt, wobei die beste zu wählende Konzentration zwischen 20 γ und 100 γ zu liegen scheint. Die Resultate sind eine Bestätigung dafür, daß die Pimelinsäure tatsächlich als Vorstufe für die Biotinsynthese zu betrachten ist.

Tabelle 46

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 29 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

	Pimelins. in γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	72,9	294	1577,75	21,45	1599,20	21,93
	20	70,0	1418	10291,00	99,27	10390,27	148,43
	100	64,8	1371	9025,75	88,81	9114,56	140,65
	2000	67,9	965	7981,50	65,54	8047,04	118,51
Aspar. ..	Kontr.	72,8	351	1941,25	25,55	1966,80	27,01
	20	82,1	1464	16480,50	120,22	16600,72	202,20
	100	78,6	1172	13824,25	92,10	13916,35	177,05
	2000	77,1	1088	11410,75	83,87	11494,62	149,08

7. Desthiobiotin

Wir haben gesehen (siehe Seite 55), daß Desthiobiotin durch Entschwefelung des Biotins entsteht, und daß es als dessen unmittelbare Vorstufe betrachtet werden kann. Es war deshalb zu vermuten, daß Desthiobiotin einen ähnlichen stimulierenden Effekt auf die Biosynthese ausübe wie die Pimelinsäure. Es ist uns aber mit unserer Versuchsanordnung nicht gelungen, diese Vermutung voll zu bestätigen. Vielmehr beobachteten wir teilweise sogar eine Hemmung der Biosynthese. Nehmen wir wiederum die pro mg Trockensubstanz erhaltenen Totalbiotinwerte, so konstatieren wir, daß nirgends solche Werte erzielt werden, wie wir sie mit Pimelinsäure erhielten. Als Vergleich mögen die prozentualen Mehr- oder Minderwerte herangezogen werden.

Auf Citratmilieu hemmen 0,1 m γ und 1 m γ Desthiobiotin die Biosynthese des Biotins um 32,28 ‰ und 33,97 ‰, 10 m γ und 20 m γ fördern diese um 62,11 ‰ und 53,30 ‰. Auf Asparaginemilieu hemmen auch hier 0,1 m γ um 26,29 ‰, 1 m γ aber erhöht die synthetisierte Menge Biotin um 137,33 ‰, 10 m γ und 20 m γ nur um 25,56 ‰ und 53,02 ‰.

Verschiedenen Mikroorganismen, so zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Seite 55), verschiedenen *Candida* Arten (23,5) gelingt es, das Desthiobiotin zu sulfurieren und in aktives Biotin umzuwandeln. Daher werden die der Nährlösung zugefügten Mengen Desthiobiotin von der testierten Menge Biotin abgezogen. Die Resultate sind in *Tabelle 47* aufgezeichnet.

Tabelle 47

Mit Asparagin 1‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

	Desth. H in m γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	70,9	529	1581,30	37,50	1618,80	22,83
	0,1	68,5	161	1047,70	11,00	1058,70	15,46
	1	68,6	164	1023,10	11,25	1034,35	15,08
	10	68,1	140	2511,50	9,52	2521,02	37,01
	20	70,0	118	2441,00	8,23	2449,23	35,00
Aspar. ...	Kontr.	59,8	888	3748,45	53,07	3801,52	63,56
	0,1	49,1	288	2286,30	14,16	2300,46	46,85
	1	50,5	298	7602,95	15,05	7618,00	150,85
	10	47,5	273	3778,25	12,96	3791,21	79,81
	20	41,7	139	4050,00	5,78	4055,78	97,26

Sie lassen deutlich erkennen, daß schwache Dosen Desthiobiotin inhibitorisch auf die Biosynthese des Biotins wirken, stärkere Dosen dagegen fördernd, wobei die Förderung auf Asparaginemilieu schon bei 1 m γ eintritt. Wie wir erfahren werden, scheint die Entwicklung mit Biotin gegenteilig zu verlaufen.

8. Biotin

Mucor Ramannianus angulisporus ist für Biotin autotroph. Uns interessierte es, zu wissen, ob Beigaben von Vitamin H auf dessen Biosynthese einwirkten.

Mit *Rhizopus suinus* hat Schopfer (23) beobachtet, daß eine Zugabe von 0,08 γ zu je 25 cm Nährlösung auf die Biosynthese des Biotins unregelmäßig teils hemmend, teils fördernd wirkt. Diese Versuche wurden ausgeführt in Funktion der Zeit mit 2 verschiedenen Stickstoffquellen: Asparagin und Ammoniumtartrat. Worley (1942) hat mit demselben Organismus ähnliche Resultate, diesmal in Funktion des Aneurins, erzielt (33).

Für *Phycomyces* fand Schopfer (22), daß Zugaben von 0,001 γ bis 0,02 γ Biotin weder auf das Gewicht, noch auf die Biosynthese des Biotins, welches auch die beigegebenen Mengen Aneurin seien, einen Einfluß ausübten.

Für unsere Versuche gebrauchten wir Biotinmengen von 0,1 m γ und 20 m γ und 2 durch ihren Stickstoff verschiedene Nährlösungen: Asparagin und Ammoniumcitrat.

Tabelle 48

Mit Asparagin 1‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 28 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe Seite 59.

	Biotin in m γ	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	50,0	70	226,70	3,51	230,21	4,60
	0,1	51,2	38	250,70	1,92	252,62	4,93
	20	52,9	63	194,60	3,35	197,95	3,74
Aspar...	Kontr.	35,8	94	269,55	3,34	272,89	7,62
	0,1	30,4	63	389,15	1,92	391,07	12,68
	20	39,0	68	271,18	2,66	273,84	7,02

Man konstatiert, daß die kleinen Mengen Biotin auf beiden Nährmedien fördern, für Asparagin mehr (68,76 %) als für Citrat (7,17 %); große Mengen dagegen inhibieren die normale Biosynthese des Biotins, auf Citratmilieu stärker als auf Asparaginemilieu. Das Biotin scheint also gerade dem Desthiobiotin entgegengesetzt zu wirken.

9. d,l- ψ -Biotin

Als letztes der untersuchten Biotine prüften wir das Verhalten des von Bourquin und Mitarbeiter (3) synthetisierten d,l- ψ -Biotin. Es wurde bereits darauf hingewiesen (siehe Seite 56), daß im Gegensatz zum Desthiobiotin und d,l- β -Biotin das d,l- ψ -Biotin biologisch unwirksam ist. Es stellte sich nun die Frage, in welchem Maße dieses inaktive Biotin die normale Biosynthese des d,l- β -Biotins beeinflussen könnte.

Den Kulturen von *M. Ram. angulisporus* gaben wir Mengen von 0,1 m γ bis 20 m γ ψ -Biotin zu. Wir bemerken, daß die auf Asparaginemilieu gewachsenen Kulturen mit jeder Dosis in ihrer Biosynthese des Biotins gehemmt werden. Für die Citrat-Kulturen tritt eine Hemmung nur mit den Dosen 10 m γ und 20 m γ auf, während 0,1 m γ und 1 m γ leicht fördernd wirken. Es ist möglich, daß das ψ -Biotin in kleinsten Mengen auf die Biosynthese des Biotins katalytisch wirkt, und zwar scheint diese Katalyse milieubedingt zu sein. Um zu einem definitiven Schluß über den Mechanismus zu kommen, müßten diese Versuche mit dem ebenfalls auf *Saccharomyces cer.* unwirksamen d,l-iso- β -Biotin vervollständigt werden.

Tabelle 49

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe Seite 59.

	d, l-ψ-H in mg	Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)	Tot. H/mg (5)
Citrat ..	Kontr.	70,9	288	1581,30	20,44	1601,74	22,59
	0,1	67,8	324	1804,00	22,00	1826,00	26,93
	1	70,1	252	1783,35	17,72	1801,07	25,69
	10	67,5	187	1225,15	12,62	1237,77	18,33
	20	71,9	185	1262,60	13,27	1275,87	17,74
Aspar...	Kontr.	59,8	457	3748,45	21,70	3770,15	63,04
	0,1	69,0	322	2410,55	22,24	2432,79	35,25
	1	65,2	230	1978,05	15,00	1993,05	30,56
	10	61,4	225	1529,90	13,82	1543,72	25,14
	20	58,3	265	1452,60	15,42	1468,02	25,18

Am Schluß dieses Abschnittes erachten wir es als lehrreich, eine Tabelle folgen zu lassen, in der für alle besprochenen Wuchsstoffe 1—9 die prozentualen Verhältnisse zwischen Vitamin und Kontrolle notiert sind. Die Prozente beziehen sich auf die Menge Total-Biotin, synthetisiert durch 1 mg Trockensubstanz. Damit sind auch die Resultate miteinander vergleichbar (siehe Tab. 50).

Beachtenswert sind nur jene Zahlen außerhalb der in biologischen Versuchen angenommenen Fehlergrenze, d. h. über $\pm 10\%$.

Man ist versucht, an Hand obiger Klassifizierung eine «Rangliste» aufzustellen je nach Förderung oder Hemmung der untersuchten Wuchsstoffe. Den Wert dieser Gruppierung je nach Wirkung ersehen wir darin, zu versuchen, eine Gesetzmäßigkeit abzuleiten, falls es überhaupt eine solche gibt (siehe Tab. 51).

Nachfolgend seien einige Bemerkungen angebracht, die zugleich diesen Abschnitt zusammenfassen:

1. Es ist nicht möglich, eines der von uns gebrauchten Nährmedien, Asparaginmilieu oder Citratmilieu, als typisch «hemmend» oder typisch «fördernd» zu bezeichnen. In der Kolonne «Förderung» (Tab. 51) ist das Asparaginmilieu 13mal, das Citratmilieu 10mal vertreten. In der Kolonne «Hemmung» sind sie es je 9 mal.
2. Förderung und Hemmung halten sich ungefähr die Waage. 13 Konzentrationen verschiedener Stoffe fördern, 18 hemmen.
3. Es gibt Substanzen, die man als in Mehrheit nur fördernd oder nur hemmend bezeichnen kann. Typisch ist die positive Wirkung der Pimelinsäure, die die 6 ersten Ränge beansprucht. Fast ebenso deutlich ist der negative Einfluß des d,l-ψ-Biotins. Dieses Psi-Biotin fördert

Tabelle 50

Prozentuale Verhältnisse zwischen Vitamin und Kontrolle. Prozente bezogen auf Total-Biotin/mg Trockensubstanz.

Vitamine		NH ₄ -Citrat	Asparagin
Pyrimidin	0,1 γ	(— 8,33) %	(— 5,74) %
	20 γ	+11,60	(+ 8,24)
Thiazol	0,1 γ	(— 0,26)	—40,57
	1 γ	(+ 4,01)	—37,87
	10 γ	+12,03	—35,89
	20 γ	—16,64	—29,12
Inositol	0,1 γ	—21,74	+32,60
	20 γ	(— 8,91)	+13,60
Pantothensäure	0,1 γ	+24,50	+85,00
	20 γ	—32,50	+32,00
Nikotinsäure	0,1 γ	—32,46	+41,32
	20 γ	—46,92	+31,33
Pimelinsäure	20 γ	+576,83	+648,61
	100 γ	+564,52	+555,55
	2000 γ	+440,40	+451,94
Desthiobiotin	0,1 m γ	—32,28	—26,29
	1 m γ	—33,97	+137,33
	10 m γ	+62,11	+25,56
	20 m γ	+53,30	+53,02
Biotin	0,1 m γ	(+ 7,17)	+68,76
	20 m γ	—18,96	(— 7,87)
Psi-Biotin	0,1 m γ	+19,12	—44,08
	1 m γ	+13,72	—51,52
	10 m γ	—18,68	—60,12
	20 m γ	—21,47	—60,05

nur schwach, an der Fehlergrenze liegend, auf Citratmilieu mit 0,1 m γ und 1 m γ . Thiazol weist eine mehrheitlich negative Wirkung auf; die Konzentration 10 γ liegt in zweitletzter Stelle in der Kolonne «Förderung».

4. Es gibt Substanzen, die nicht mehrheitlich hemmen oder fördern, sondern in beiden Kolonnen vertreten sind. Die Nikotinsäure hemmt auf Citratmilieu, fördert auf Asparaginemilieu (Tab. 50). Inositol, Biotin und Desthiobiotin sind auch in diese Kategorie einzureihen.

Tabelle 51

Gruppierung der Wuchsstoffe 1—9 je nach ihrer fördernden oder hemmenden Wirkung auf die Biosynthese des Biotins. Zahlen übernommen von Tabelle 50.

Förderung		Hemmung	
1. Pimelinsäure	20 γ Aspa. 648,61 %	1. Psi-Biotin	10 m γ Aspa. 60,12 %
2. »	20 γ Citr. 576,83	2. »	20 m γ Aspa. 60,05
3. »	100 γ Citr. 564,52	3. »	1 m γ Aspa. 51,52
4. »	100 γ Aspa. 555,55	4. Nikotinsäure	20 γ Citr. 46,92
5. »	2000 γ Aspa. 451,94	5. Psi-Biotin	0,1 m γ Aspa. 44,08
6. »	2000 γ Citr. 440,40	6. Thiazol	0,1 γ Aspa. 40,57
7. DesthioH	1 m γ Aspa. 137,33	7. »	1 γ Aspa. 37,87
8. Pantothens.	0,1 γ Aspa. 85,00	8. »	10 γ Aspa. 35,89
9. Biotin	0,1 m γ Aspa. 68,76	9. Desthio-H	1 m γ Citr. 33,97
10. Desthio-H	10 m γ Citr. 62,11	10. Nikotinsäure	0,1 γ Citr. 32,46
11. »	20 m γ Citr. 53,30	11. Desthio-H	0,1 m γ Citr. 32,28
12. »	20 m γ Aspa. 53,02	12. Thiazol	20 γ Aspa. 29,12
13. Nikotinsäure	0,1 γ Aspa. 41,32	13. Desthio-H	0,1 m γ Aspa. 26,29
14. Inositol	0,1 γ Aspa. 32,60	14. Inositol	0,1 γ Citr. 21,74
15. Pantothensäure	20 γ Aspa. 32,00	15. Psi-Biotin	20 m γ Citr. 21,47
16. Nikotinsäure	20 γ Aspa. 31,33	16. Biotin	20 m γ Citr. 18,96
17. Desthio-H	10 m γ Aspa. 25,56	17. Psi-Biotin	10 m γ Citr. 18,68
18. Pantothensäure	0,1 γ Citr. 24,50	18. Thiazol	20 γ Citr. 16,64
19. Psi-Biotin	0,1 m γ Citr. 19,12		
20. »	1 m γ Citr. 13,72		
21. Inositol	20 γ Aspa. 13,60		
22. Thiazol	10 γ Citr. 12,03		
23. Pyrimidin	20 γ Citr. 11,60		

- Wir fanden keinen so stark hemmenden wie fördernden Stoff. Die maximale Förderung von 648,61 % ist erreicht mit 20 γ Pimelinsäure auf Asparaginemilieu; die höchste Hemmung erreicht 60,12 %, auch auf Asparaginemilieu.
- Das Pyrimidin scheint auf die Biosynthese des Biotins auf beiden verwendeten Nährlösungen praktisch keinen Einfluß auszuüben. Es ergibt sich also die Tatsache, daß die Komponenten des Aneurins, Pyrimidin und Thiazol, einzeln die Biotinsynthese hemmen (Thiazol) oder ihr gegenüber indifferent ist (Pyrimidin), im Aneurinmolekül gekoppelt aber wirken sie sich auf die Biosynthese günstig aus.
- Alle Versuche wurden in Funktion des Wuchsstoffes ausgeführt, und in der Regel wurden die Kulturen nach 30 Tagen geerntet. Vermutlich werden erst Versuche, ausgeführt in Funktion der Zeit, die nötigen Aufklärungen über den Einfluß der von uns untersuchten Stoffe auf die Biosynthese des Biotins bringen.

B. AMINOSÄUREN

Eine Gruppe für sich, die zur Untersuchung gelangt, bilden die Aminosäuren. Nach Schöpferschem Begriff (21) sind die Aminosäuren an der Grenze zwischen Wuchsstoffen und gewöhnlichen Nährstoffen. Einzelne Aminosäuren, die Bestandteile von Vitaminen sind (β -Alanin) oder Vorstufe eines Vitamins (Tryptophan), müssen als Wirkstoffe bezeichnet werden. Inwieweit diese Stoffklasse die Biosynthese des Biotins zu beeinflussen vermag, sollen anschließend folgende Versuche zeigen.

1. Versuche mit 2 Mischungen von Aminosäuren

Es wurden 2 verschiedene Mischungen, A und B, untersucht. Es handelt sich um äquilibrierte Mischungen natürlicher Aminosäuren, die durch Hydrolyse eines natürlichen Proteins erhalten worden sind. Mengen von 0,05 ccm bis 2 ccm (siehe I. Teil, Seite 32) wurden je 25 ccm Nährlösung beigegeben. Sowohl die Mischung A wie die Mischung B beeinflussen die Biosynthese des Biotins in geringem Maße. In *Tabelle 52* sind die Verhältnisswerte Totalbiotin/mg Trockengewicht sowie die prozentualen Veränderungen gegenüber den Kontrollen aufgezeichnet.

Tabelle 52

Mit Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen.

	Mengen in ccm	Gewicht in mg	Total H/mg TG in μ g	+ — %
Misch. A	Kontr.	69,9	30,43	—
	5/100	71,6	32,43	+ 6,57
	2,5/10	71,7	33,04	+ 8,57
	5/10	73,1	41,85	+37,52
	1	72,4	41,91	+37,72
	2	73,0	32,71	+ 7,49
Misch. B	Kontr.	49,1	42,25	—
	5/100	50,0	41,33	— 2,17
	2,5/10	51,8	52,27	+23,71
	5/10	50,5	50,32	+19,10
	1	54,8	37,53	—11,17
	2	55,1	55,17	+30,57

Mischung A ergab die besten Resultate mit den Konzentrationen von 0,5 ccm und 1 ccm pro Kultur. Mit den übrigen Konzentrationen bleibt die Wirkung positiv, jedoch innerhalb der Fehlergrenze.

Das Verhalten der Mischung B ist unregelmäßig. Positive und negative Wirkungen wechseln miteinander ab. Auch hier wären Versuche, ausgeführt in Funktion der Zeit, sicher sehr aufschlußreich.

2. β -Alanin

In der Besprechung der Pantothensäure haben wir die Tatsache festgelegt, daß β -Alanin ein Konstituent dieser Säure ist (siehe Seite 68) und als dessen Vorstufe zu gelten hat. Die Pantothensäure aber übt auf die Biosynthese eher einen günstigen Einfluß aus (siehe Seite 68). Inhibitorisch wirkt sie nur in einer Konzentration von 20 γ auf Citratmilieu. Nachfolgend seien die Resultate in *Tabelle 53* aufgezeichnet. Die Zahlen geben die Verminderung und Vergrößerung der Biosynthese des Biotins gegenüber den Kontrollen in Prozenten an.

Tabelle 53

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 19°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen.

β -Alanin	Citratmilieu	Asparaginmilieu
0,1 γ	(+ 5,35) %	+60,67 %
20 γ	+36,60	(+ 0,73)
100 γ	(− 6,28)	+59,38
500 γ	+14,25	+44,07
1000 γ	+11,62	+41,00

Auffallend ist der milieubedingte Unterschied der verschiedenen Konzentrationen. Bei 0,1 γ maximale Steigerung mit Asparagin, innerhalb der Fehlergrenze liegende Förderung auf Citratmilieu. Für 20 γ β -Alanin dagegen Förderung auf Citratmilieu, praktisch kein Effekt auf Asparaginmilieu; in einigen Versuchen haben wir sogar eine Hemmung beobachtet. Dieses etwas sprunghafte Verhalten des β -Alanins setzt sich bei der Dosis 100 γ fort. Die mit Citrat festgestellte Hemmung liegt innerhalb der Fehlergrenze, die Förderung auf Asparaginmilieu tangiert das mit 0,1 γ erreichte Maximum. Stärkere Konzentrationen von β -Alanin zeigen nur fördernde Wirkung, sowohl auf Citrat- wie auf Asparaginmilieu, jedoch schwächer auf jenem als auf diesem. Man kann sagen, daß kleine Mengen (0,1 γ) und auch größere (100, 2000 γ) β -Alanin die Biosynthese des

Biotins auf Asparaginmilieu günstig beeinflussen. Für Citrat scheint das eher in den mittleren Konzentrationen (20 γ) der Fall zu sein.

Greifen wir aus Tabelle 50 die Resultate, die Pantothersäure betreffend heraus, so ergeben sich im Vergleich folgende Bemerkungen:

Tabelle 54

		0,1 γ	20 γ
β -Alanin	Asparagin	+60,67 %	(+ 0,73) %
Pantothersäure	"	+85,00	+32,00
β -Alanin	Citrat	(+ 5,35)	+36,60
Pantothersäure	"	+24,50	—32,50

Wir können die Vermutung aufstellen, daß, wo das β -Alanin allein positiv wirkt, es seine fördernde Wirkung auch im Molekülverband beibehält. Die Resultate mit 0,1 γ β -Alanin auf Asparaginmilieu stimmen ziemlich gut mit unserer Hypothese überein, jedoch sehr schlecht diejenigen mit 20 γ auf Citratmilieu, einigermaßen gut in den 2 andern Fällen. Inwieweit die andere Komponente der Pantothersäure, ein Lakton, (siehe I. Teil, Seite 27) auf die Biosynthese des Biotins einwirkt, wurde nicht untersucht. Jedenfalls sind obige Resultate, was die Wirkung des β -Alanins betrifft, mit Reserve aufzufassen, da verschiedene Autoren beobachtet haben (21), daß diese Aminosäure oft nur im Verein mit andern Aminosäuren oder Vitaminen wirksam ist, allein aber oft toxisch wirkt.

3. Schwefelhaltige Aminosäuren

Ueber die Rolle der SH-Gruppe als möglicher Wirkstoff herrscht noch Unklarheit. Schopfer (21) neigt zu der Ansicht, daß diese Gruppe eher als Vorstufe von Substanzen dient, die dann wie richtige Wirkstoffe funktionieren.

1942 publizierten R. E. Eakin und E. Eakin (2) eine Arbeit, die über die Rolle von S-haltigen Aminosäuren, allein und kombiniert mit Pimelinsäure, in der Biosynthese des Biotins Aufschluß gab. Diese Autoren vermuteten mit Recht, daß dieser Schwefel sich für die Biotinsynthese als günstig erweisen müßte. Als Testobjekt verwendeten sie *Aspergillus niger*, dessen Wachstum weder von der Pimelinsäure noch vom Biotin beeinflußt wird, d. h. autotroph ist für diese beiden Stoffe. *Aspergillus* besitzt also den für die Biosynthese nötigen Mechanismus. Die Autoren erhielten mit Pimelinsäure die schon besprochene Förderung der Biosynthese (siehe Seite 70), die jedoch verdoppelt werden konnte bei Zugabe von Cystin.

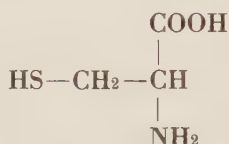
Einen wertvollen Beitrag zum Problem der Biosynthese des Biotins lieferten auch die Versuche mit einem *Penicillium chrysogenum* (26), das Desthiobiotin synthetisieren kann, nicht aber Biotin, welches das Wachstum nicht beeinflußt. Eine Zugabe von Pimelinsäure fördert die Produktion an Desthiobiotin um das 13fache. Eine Zugabe von Cystin dagegen hat überhaupt keinen Einfluß auf die Biosynthese des Desthiobiotins bei *P. chrysogenum*.

Das scheint ein Beweis dafür zu sein, daß die Pimelinsäure von Mikroorganismen zur Synthese des Desthiobiotins gebraucht wird und daß Stoffe wie Cystin das Desthiobiotin zu Biotin umwandeln.

Wir hatten uns nun die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, ob diese Verhältnisse auch für *Mucor Ramannianus angulispurus* Gültigkeit besitzen. Es wurde deshalb folgender Versuch angesetzt.

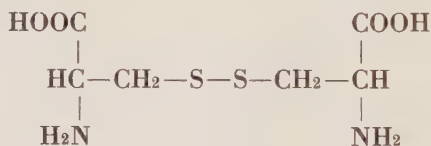
Nachstehende 3 Aminosäuren wurden auf ihr Verhalten gegenüber der Biosynthese des Biotins geprüft:

1. Cystein

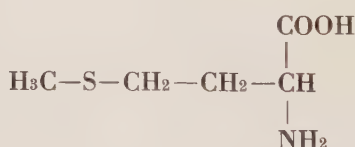


welches sich leicht zu dem entsprechenden Disulfid oxydieren läßt,

2. Cystin



3. Methionin



Diese 3 Aminosäuren wurden in Quantitäten von je 1 mg den Kulturen zugefügt. In einer parallelen Versuchsreihe gaben wir zu je 1 mg Pimelinsäure 1 mg der 3 obgenannten Aminosäuren. Die Resultate sind in *Tabelle 55* wiedergegeben.

Tabelle 55

Mit Asparagin 1 ‰ und Ammoniumcitrat 0,01 m. Alter der Kulturen 30 Tage. Temp. 21°. Durchschnittswerte von 12 Kulturen. Ziffern in () siehe S. 59.

- | | |
|----------------------|---------------------------------------|
| 1. Kontrollen | 5. 1 mg Methionin |
| 2. 1 mg Pimelinsäure | 6. 1 mg Pimelinsäure + 1 mg Cystein |
| 3. 1 mg Cystein | 7. 1 mg Pimelinsäure + 1 mg Cystin |
| 4. 1 mg Cystin | 8. 1 mg Pimelinsäure + 1 mg Methionin |

		Gewicht in mg	T (1)	M (2)	T (3)	M + T (4)
Citrat ..	1.	52,8	411	2529,75	21,72	2551,47
	2.	51,9	1413	9252,50	73,34	9325,84
	3.	58,3	469	2577,00	27,35	2604,35
	4.	50,1	410	3505,00	20,55	3525,55
	5.	48,6	315	2620,50	15,30	2635,80
	6.	59,2	976	10144,50	57,75	10202,25
	7.	53,1	1127	9839,00	59,80	9898,80
	8.	49,7	859	8434,00	42,71	8476,71
Aspar. ..	1.	44,2	399	2123,00	17,49	2140,49
	2.	43,0	908	6424,50	39,04	6463,54
	3.	36,3	291	1697,00	10,59	1707,59
	4.	38,5	184	1591,50	7,06	1598,56
	5.	58,8	319	3153,50	18,73	3172,23
	6.	34,1	874	5476,00	29,81	5505,81
	7.	35,3	639	6815,50	22,55	6838,05
	8.	50,2	1015	8662,50	50,95	8713,45

Wie wir erwarteten, bestätigten sich die Resultate, die wir mit Pimelinsäure vorhergehend gefunden hatten, indem diese Säure die Biotinsynthese stark fördert. Cystein, Cystin und Methionin allein scheinen auf Citratmilieu leicht fördernd oder indifferent zu sein; auf Asparaginemilieu dagegen scheinen die 2 erstgenannten Aminosäuren eher zu hemmen und Methionin leicht zu fördern. In Kombination mit Pimelinsäure erreichen wir die maximale Produktion an Biotin mit Cystein auf Citratmilieu und mit Methionin auf Asparaginemilieu. Beide Werte liegen höher als die mit Pimelinsäure allein erreichten. Diese Werte jedoch ändern sich, betrachten wir die Menge Totalbiotin, die pro mg Trockensubstanz synthetisiert wird und die sich aus diesen Zahlen ergebenden prozentualen Berechnungen (siehe Tab. 56).

Tabelle 56

Erklärungen im Text

	Citrat- milieu	Asparagin- milieu	Citrat- milieu	Asparagin- milieu
	in my		in ‰	
1.	48,32	48,42	—	—
2.	179,68	150,31	271,85	210,42
3.	44,67	47,04	—7,55	— 2,85
4.	70,37	41,52	45,61	—14,25
5.	54,23	53,94	12,23	11,40
6.	172,33	161,46	256,64	233,45
7.	186,41	190,85	285,78	294,15
8.	170,55	173,57	211,56	258,46

Die Pimelinsäure, allein, steigert nach wie vor die Biotinsynthese. Cystein, allein, gibt negative Werte, die jedoch innerhalb der Fehlergrenze liegen. Cystin, allein, fördert auf Citratmilieu, hemmt auf Asparaginemilieu. Die Förderung des Methionins, allein, liegt hart an der Fehlergrenze.

Im Kombinationsversuch mit Pimelinsäure erhalten wir auf Citratmilieu nur mit Cystin Werte, die über denjenigen mit Pimelinsäure, allein, stehen. Auf Asparaginemilieu ist das Maximum auch mit Cystin erreicht; die Werte der 2 andern Aminosäuren stehen aber über denjenigen mit Pimelinsäure, allein. Nachstehend seien die Prozente, bezogen auf die Pimelinsäure, angegeben (siehe Tab. 57).

Tabelle 57

Erläuterungen im Text

	Citratmilieu	Asparaginemilieu
1.	—73,10 ‰	—67,78 ‰
2.	—	—
3.	—75,14	—68,70
4.	—60,83	—72,37
5.	—69,74	—64,11
6.	— 4,09	+ 7,41
7.	+ 3,74	+26,97
8.	— 5,08	+15,47

Es scheint, als ob die Asparagin enthaltende Nährlösung vorteilhafter sei, denn hier wirken alle 3 Aminosäuren positiv. Mit Citrat-Nährlösung wirkt nur das Cystin schwach positiv, Cystein und Methionin dagegen schwach negativ.

Bei der Betrachtung beider Tabellen fällt eines sofort auf: auf Asparaginemilieu hemmt 1 mg Cystin die Biosynthese des Biotins um 14,25 %. Dasselbe Cystin, zusammen mit 1 mg Pimelinsäure, erreicht aber das Förderungsmaximum von 294,15 %! Ähnlich, aber weniger ausgeprägt, reagiert auch Cystein. Auf Citratmilieu reagiert nur Cystein auf diese Weise; Cystin fördert allein ja 45,61 %. Dieses Verhalten verschiedener Stoffe allein negativ und im Verband mit andern Stoffen positiv zu wirken, haben wir bereits an Hand des Beispiels des β -Alanins, des Pyrimidins und Thiazols besprochen.

Entgegen den Ergebnissen mit *Aspergillus*, wo kein Einfluß auf das Wachstum zu bemerken war, ist dies für *M. Ram. angulisporus* nicht ganz der Fall (siehe I. Teil, Seite 33).

Wir stellen fest:

1. Die Pimelinsäure übt einen stark fördernden Einfluß auf die Biosynthese des Biotins aus.
2. Die 3 untersuchten schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein, Cystin und Methionin wirken teils hemmend, teils fördernd.
3. Dieselben Aminosäuren, zusammen kombiniert mit Pimelinsäure, fördern die Biosynthese ebenfalls stark, jedoch ist ein der Pimelinsäure zusätzlicher Effekt nur mit Cystin und Methionin auf Asparaginemilieu zu beobachten.

VII. Zusammenfassung

1. *Mucor Ramannianus* und *M. Ram. angulisporus* sind für Biotin autotroph. Dieses Vitamin wird von diesen Organismen synthetisiert und häuft sich in der Nährlösung an. Der im Thallus verbleibende Teil ist gering.

2. Die Biosynthese des Biotins erfolgt auf einer synthetischen Nährlösung, die Glucose, Asparagin oder Ammoniumcitrat als Stickstoffquelle, und Salze enthält.

3. Für *Mucor Ramannianus* nimmt der Biotingehalt mit dem Grad der Entwicklung zu, d. h. mit steigenden Mengen Aneurin. Die relativ höchste Biotinmenge wird jedoch von den Kontrollen produziert. Das zur Entwicklung von *Mucor Ramannianus* notwendige Aneurin scheint die Biosynthese des Biotins zu hemmen.

4. Für *M. Ram. angulispurus*, autotroph für Aneurin, ist die produzierte relative Biotinmenge mehr oder weniger unabhängig von der Konzentration des B₁. Seine beiden Komponenten Pyrimidin und Thiazol fördern die Biotinsynthese ebenfalls nicht.

5. Die relative Biotinmenge erreicht mit *M. Ram. angulispurus* höhere Werte als mit *Mucor Ramannianus*. Diese Höchstwerte werden erhalten nach einer Wachstumsperiode von 30 Tagen. Nachher sinkt sie wieder ab.

6. *M. Ram. angulispurus* besitzt die Fähigkeit, das Biotin aus seiner Vorstufe Pimelinsäure aufzubauen.

7. *M. Ram. angulispurus* reagiert auf die Mischung Pimelinsäure + S-haltige Aminosäure auf Asparaginemilieu, indem seine Biotinsynthese gesteigert wird.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Bern in der Zeit vom Herbst 1945 bis Ende des Jahres 1947 ausgeführt.

Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer, unter dessen Anregung und Leitung diese Untersuchung ausgeführt wurde, für die Unterstützung und das große Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegenbrachte, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATURVERZEICHNIS DES I. TEILS

1. *Berthelot, A.*, Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 1934, 16, 1553.
2. *Bonner, J.*, und *Buchmann, E. R.*, Proc. Nat. Acad. Sc. Wash. 1938, 24, 431.
3. *Debrit, F. P.*, und *Schopfer, W. H.*, Exper. 1946, Vol. II, Fasc. 8, 312.
4. *Eakin, R. E.*, und *E.*, Science (N. Y.) 1942, 96, 187.
5. *Gautheret, R. J.*, Manuel techn. d. cult. d. tissus vég. Paris 1942, p. 52.
6. *Knight, B. C. J. G.*, British J. Exp. Path., 1935, 16, 315; Biochem. J. 1937, 31, 731.
7. *Mueller, J. H.*, J. Bacter., 1937, 34, 163 u. 429.
8. *Müller, F. W.*, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 1937, 47, 277.
9. *Müller, F. W.*, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 1941, 51, 165, 171, 172, 177, 197, 214, 236 u. f.
10. *Müller, F. W.*, et *Schopfer, W. H.*, C. r. Acad. Sci. Paris 1937, 205, 687.
11. *Naoumoff, N. A.*, Encycl. Myc. IX, Clefs d. Mucorinées, Paris 1939.
12. *Nielsen, N.*, und *Hartelius, V.*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, 1938, 22, 271; Biochem. Zschr. 296, 359.
13. *Schopfer, W. H.*, Arch. f. Mikrobiol., 1935, 6, 290.
14. *Schopfer, W. H.*, Zeitschr. f. Vitf. 1945, 16, 186 u. f., 188, 221.
15. *Schopfer, W. H.*, Plants and Vitamins, Vol. XI, «A new series of Plant science Books», Waltham, 1943, p. 41, 104, 105, 140, 205, 225.
16. *Williams, R. J.*, und *Rohrmann, E.*, Amer. Chem. Soc. 1936, 58, 695.

LITERATURVERZEICHNIS DES II. TEILS

1. *Duschinsky, R.*, *Dolan, A. L.*, *Flower, D.*, *Rubin, S. H.*, Arch. Biochem. 1945, 6, 480.
2. *Eakin, R. E.*, und *Eakin, E. A.*, Science (N. Y.) 1942, 96, 188.
3. *Grüßner, A.*, *Bourquin, J. P.*, *Schnider, O.*, Helv. Chim. Acta, 1945, 28, 517.
4. *Harris, S. A.*, *Wolf, D. E.*, *Mozingo, R.*, *Folkers, K.*, Science (N. Y.) 1943, 97, 447.
5. *Hijner J. A.*, Exper. 1946, Vol. II, Fasc. 8, 312.
6. *Hofmann, K.*, *Melville, D. B.*, *du Vigneoud, V.*, J. Biol. Chem., 1941, 141, 207. Science (N. Y.) 1941, 94, 308. J. Biol. Chem., 1942, 144, 513. J. Biol. Chem., 1942, 145, 101.
7. *Hofmann, K.*, Amer. Chem. Soc., 1945, 67, 694.
8. *Hofmann, K.*, und *Winnick, T.*, J. Biol. Chem., 1945, 160, 445.
9. *Hofmann, K.*, und *Winnick, T.*, J. Biol. Chem., 1945, 160, 449.
10. *Kilmer und Armstrong*, J. Biol. Chem., 1942, 145, 495, 503 und 1943, 146, 475.
11. *Kögl, F.*, und *Tönnis, B.*, Z. physiol. Chem., 1936, 242, 43.
12. *Kögl, F.*, und *Pons, L.*, Z. physiol. Chem., 1941, 269, 61.
13. *Kögl, F.*, *de Man, Th. J.*, 1941, 269, 81.
14. *Kögl, F.*, *Erxleben, H.*, *Verbeek, J. H.*, Z. physiol. Chem., 1942, 276, 63.
15. *Kögl, F.*, *ten Ham, E. J.*, Z. physiol. Chem., 1943, 279, 141. Naturwiss., 1943, 31, 208.
16. *Kögl, F.*, *ten Ham, E. J.*, Z. physiol. Chem., 1943, 279, 143.
17. *Melville, D. B.*, *Hofmann, K.*, *Hague, E.*, *du Vigneoud, V.*, J. Biol. Chem., 1942, 142, 615.

18. *Melville, D. B., Moyer, A. W., Hofmann, K., du Vigneaud, V.*, J. Biol. Chem., 1943, 146, 487.
19. *Mueller, J. H.*, J. Biol. Chem., 1937, 119, 121. Journ. Bact., 1937, 34, 163. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1937, 36, 706.
20. *Pilgrim, F. J., Axelrod, A. E., Winnick, T., Hofmann, K.*, Sci. (N. Y.) 1945, 102, 35.
21. *Schopfer, W. H.*, Plants und Vitamins, Vol. XI, «A new series of Plant science Books», Chronica bot. Comp. Waltham, 1943, S. 132, 185.
22. *Schopfer, W. H.*, Zeitschr. f. Vitf., 1943, 14, 42, 54, 55, 61, 68.
23. *Schopfer, W. H., und Mlle. M. Guilloud*, Zeitschr. f. Vitf., 1945, 16, 129, 131, 181, 274, 288, 289.
24. *Snell, E., Eakin, R. E., Williams, J.*, Amer. Chem. Soc., 1940, 62, 175.
25. *Tatum, E. L.*, Annual review of biochem. Stanford Univ., 1944, 13, 667.
26. *Tatum, E. L.*, J. Biol. Chem., 1945, 160, 455.
27. *du Vigneaud, V.*, Sci. (N. Y.), 1940, 92, 609.
28. *du Vigneaud, V., Dittmer, K., Hofmann, K., Melville, D. B.*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1942, 50, 374.
29. *du Vigneaud, V., Dittmer, K., Hague, E., Long, B.*, Sci. (N. Y.), 1942, 96, 186.
30. *du Vigneaud, V., Melville, D. B., Folkers, K., Wolf, D. E., Mozingo, R., Keresztesy, J. C.*, mit *Harris, S. A.*, J. Biol. Chem., 1943, 146, 475, 485.
31. *du Vigneaud, V., Dittmer, K., Melville, D. B.*, Sci. (N. Y.), 1944, 99, 203.
32. *du Vigneaud, V., und Dittmer, K.*, Sci. (N. Y.), 1944, 100, 130.
33. *Worley, C. L.*, Plant Physiol., 1942, 17, 278.

Curriculum vitae

Ich wurde am 2. März 1922 in Bern geboren und bin in Genf heimatberechtigt. Nach Absolvierung der obligatorischen Schuljahre in Bern, begab ich mich nach Neuenburg, wo ich 1941 in der dortigen Höh. Handelsschule die Maturität bestand. Im Herbst 1941 immatrikulierte ich mich an der philosophischen Fakultät II der Universität Bern, wo ich mich dem Botanik-Studium zuwandte. Neben dem Hauptfach besuchte ich Vorlesungen und Uebungen in Chemie, Physiologie, physiol. Chemie, Bakteriologie und Zoologie.

Seit dem Sommersemester 1945 war ich Assistent am Botanischen Institut und Garten der Universität Bern (Prof. Schopfer).

